

Aus dem Institut für Veterinärbiochemie und Molekularbiologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. U. Hübscher)

**Isolierung von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen
mittels Oligo-Pulldown Assay**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

Fabian Kälin

Tierarzt von Einsiedeln

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. M. Hottiger, Referent
Prof. Dr. H. Naegeli, Korreferent

Zürich 2003

Druck: Kantonale Drucksachen-
und Materialzentrale Zürich

**Für meine Eltern
Hildegard und Franz**

**Und meine Geschwister
Jonas und Jasmin**

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	3
1.1 Deutsch	3
1.2 English	3
2 Einleitung	5
2.1 Die Familie der NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteine	5
2.1.1 Die NF- κ B/Rel-Proteine	5
2.1.2 Die I κ B-Proteine	7
2.2 Die dreidimensionale Struktur von NF- κ B	8
2.3 Aktivatoren und Inhibitoren von NF- κ B	9
2.4 Die Aktivierungskaskade von NF- κ B	11
2.5 Die Bedeutung von NF- κ B	14
2.5.1 NF- κ B und Entzündung	15
2.5.2 NF- κ B und Neoplasie	16
2.5.3 NF- κ B und Neurone	17
3 Problemstellung und Projektbeschreibung	19
3.1 Problemstellung	19
3.2 Projektbeschreibung	20
4 Resultate	21
4.1 Induktion von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien	21
4.1.1 HeLa Zellen	21
4.1.2 THP-1 Zellen	22
4.1.3 Jurkat Zellen	23
4.1.4 Hodgkin Zellen	24
4.1.5 Protease- und Nuklease-Tests	25
4.2 Übersicht über das System des Oligo-Pulldown Assays	25
4.3 Optimierung des Oligo-Pulldown Assays	26
4.3.1 Ermittlung der Bindungsspezifität von NF- κ B an die κ B-Konsensus-Sonde	27
4.3.2 Optimierung des Oligo-Pulldown Assays für die HIV-LTR- und die TLR-2-Sonden	28
4.3.2.1 Optimierung von Bindungszeit und -temperatur	29
4.3.2.2 Optimierung der pH-Bedingungen im Bindungspuffer	30
4.3.2.3 Optimierung der Salzkonzentration im Bindungspuffer	31
4.3.2.4 Optimierung der Salzkonzentration im Waschpuffer	32
4.3.2.5 Optimierung der Kompetitor-DNS	33
4.3.2.6 Optimierung des Verhältnisses von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde	35
4.4 Analyse von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie	37
4.4.1 Auftrennung der im Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteine mittels SDS-PAGE	37
4.4.2 Oligo-Pulldown Assay von THP-1, Jurkat und Hodgkin Zellextrakten mit den TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden (Silbergel und Western-Blot Analyse)	40
4.4.3 Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden	43
4.5 Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Promotorsequenz	45

5	Diskussion	48
5.1	Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien	48
5.2	Optimierung des Oligo-Pulldown Assays	49
5.3	Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden	53
5.4	Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Promotorsequenz	54
5.5	Schlussbemerkung	55
6	Methoden und Material	56
6.1	Zellkultur	56
6.1.1	Zelllinien	56
6.1.2	Kultivierung der Zellen	56
6.1.3	Zellstimulation	56
6.1.3.1	HeLa Zellen	56
6.1.3.2	Jurkat Zellen	57
6.1.3.3	THP-1 Zellen	57
6.1.4	Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten	57
6.1.5	Protease-Test der nukleären Zellextrakte	58
6.1.6	Nuklease-Test der nukleären Zellextrakte	58
6.2	Bakterienkultur	59
6.2.1	Herstellung von kompetenten Zellen	59
6.2.2	Transformation	59
6.2.3	Plasmid-Minipräparation	59
6.3	DNS-Sonden und Kompetitor-DNS	60
6.3.1	Die κ B-Konsensus-Sonden und die κ B-Kompetitor-DNS	60
6.3.2	Die TLR-2-Sonde	61
6.3.3	Die HIV-LTR-Sonde	62
6.3.4	Annealen der κ B-/ $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonden und κ B-/ $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS	63
6.3.5	Linearisierung des leeren pGL3-Vektors	63
6.3.6	PCR-Amplifikation	63
6.4	Der Oligo-Pulldown Assay	65
6.4.1	Der Oligo-Pulldown Assay zur Isolierung von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen	65
6.4.2	Der Oligo-Pulldown Assay zur Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Bindungssequenz	65
6.4.3	Puffer für den Oligo-Pulldown Assay	66
6.5	SDS-PAGE	66
6.6	Western-Blot Analyse	67
6.7	Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele	67
6.8	Massenspektrometrieanalyse	68
6.9	Materialliste	69
6.10	Geräteliste	70
7	Literaturverzeichnis	71
8	Abkürzungen	79
9	Dankesadressen	81

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsch

Der Nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der bei Entzündungen, Krebs und zahlreichen anderen Krankheiten eine zentrale Rolle spielt. NF- κ B ist einer der am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren. Trotzdem ist wenig über die Mechanismen bekannt, wie NF- κ B durch Bindung an seine Promotorsequenz die Transkription der entsprechenden Gene stimuliert. Um diese Vorgänge genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuchssystem auf der Basis eines Oligo-Pulldown Assays etabliert, mit welchem NF- κ B-abhängige Enhanceosomen isoliert werden konnten. Dazu wurden Zelllinien ausgewählt, in denen durch geeignete Stimuli die Aktivität von NF- κ B induziert werden konnte. Die THP-1 und die Jurkat Zelllinie erwiesen sich im Gegensatz zur HeLa Zelllinie als ausgezeichnet stimulierbar. Die Hodgkin Zelllinie musste nicht stimuliert werden, da in diesen Zellen NF- κ B konstitutiv aktiv ist.

In einem Oligo-Pulldown Assay können mit Hilfe von DNS-Sonden, welche an Beads (Kügelchen) gekoppelt werden, DNS-bindende Proteine effizient isoliert werden. Dieses Versuchssystem wurde in mehreren Schritten für NF- κ B-Promotorsequenzen als DNS-Sonden optimiert. Zuerst wurde NF- κ B mit einer synthetischen NF- κ B-Konsensussequenz aus nukleären Zellextrakten isoliert und die Spezifität der NF- κ B-Bindung an die DNS-Sonde überprüft. Für die Verwendung von natürlich vorkommenden Promotorsequenzen als DNS-Sonden (Sequenzen aus dem murinen TLR-2-Promotor und dem long terminal repeat des menschlichen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-LTR)) mussten die Versuchsbedingungen weiter entwickelt werden. Schliesslich konnten mit dem optimierten Oligo-Pulldown Assay Enhanceosomen aus nukleären Zellextrakten isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert werden. Der Einsatz von gezielt mutierten Promotorsequenzen als DNS-Sonden ermöglichte zudem den Nachweis von Proteinen, welche eine Sequenz-spezifische Bindung zeigten. Zwei dieser Proteine wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert: Die Proteine „KIAA1455“ und „Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)“ wurden mit der HIV-LTR-Promotorsequenz aus nukleären Zellextrakten von Jurkat bzw. THP-1 Zellen isoliert. Die Bedeutung der identifizierten Proteine im Zusammenhang mit NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen muss noch geklärt werden.

Zusätzlich wurde demonstriert, dass sich der Oligo-Pulldown Assay auch zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen am Promotor eines Gens eignete. Mit einem modifizierten Oligo-Pulldown Assay konnte nämlich gezeigt werden, dass I κ B α zwar die Bindung von NF- κ B an dessen Bindungssequenz verhindern, nicht jedoch die Dissoziation von bereits gebundenem NF- κ B von der DNS bewirken kann.

1.2 English

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a highly inducible transcription factor that plays an important role in inflammation, carcinogenesis and many other diseases. NF- κ B is one of the most studied transcription factors. But there is still little known about the mechanisms which enable NF- κ B to stimulate gene transcription after binding to the corresponding promoter sequence. To study these processes in detail, a new experimental system on the basis of an oligo-pulldown assay was set up that allowed the isolation of NF- κ B-dependent enhanceosomes. For that purpose, cell lines were selected in which NF- κ B activity was inducible by appropriate stimuli. An excellent stimulation of NF- κ B activity was achieved in the THP-1 and Jurkat cell line but not in the HeLa cell line. The Hodgkin cell line did not need to be stimulated because in these cells NF- κ B is constitutively active.

The oligo-pulldown assay is an effective method to isolate DNA-binding proteins with DNA probes that are linked to beads. This experimental tool was optimised in several steps for the use of NF- κ B promoter sequences as DNA probes. First, NF- κ B was isolated from nuclear extracts with a synthetic NF- κ B consensus sequence and the specificity of NF- κ B binding to the DNA probe was confirmed. To be able to use naturally occurring promoter sequences as DNA probes (sequences of the murine TLR-2 promoter and the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-LTR)) the experimental conditions of the assay had to be further developed. With the optimised oligo-pulldown assay enhanceosomes were isolated from nuclear cell extracts and analysed by SDS-PAGE. The use of specifically mutated promoter sequences as DNA probes allowed the detection of proteins that displayed sequence-specific binding characteristics. Two of these proteins were identified by mass spectrometry: The proteins „KIAA1455“ and „Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)“ were isolated with the HIV-LTR promoter sequence from nuclear extracts of Jurkat and THP-1 cells, respectively. The relevance of the identified proteins in the context with NF- κ B-dependent enhanceosomes remains to be investigated.

Additionally it was demonstrated that the oligo-pulldown assay could also be adapted for the study of protein-protein interactions at the site of the promoter of a specific gene. In a modified oligo-pulldown assay it was shown that I κ B α prevented the binding of NF- κ B to the corresponding binding site, but was not able to dissociate bound NF- κ B from the DNA template.

2 Einleitung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist eine sehr komplexe Struktur, welche die Information für alle zelleigenen Proteine enthält. Damit in der richtigen Zelle zur richtigen Zeit die gerade benötigten Proteine synthetisiert werden, braucht es Moleküle, die deren Synthese regulieren, sogenannte Transkriptionsfaktoren. Ein solches Regulatorprotein ist der Nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B), welcher 1986 von Sen und Baltimore entdeckt wurde (1). Durch die Bindung von NF- κ B an spezifische DNS-Abschnitte werden bestimmte Gene aktiviert, was wiederum zur Synthese der von den Genen kodierten Proteine führt. Bei den Transkriptionsfaktoren werden verschiedene Arten unterschieden: Einerseits die konstitutiven Faktoren, die dauernd aktiv sind, und andererseits die induzierbaren Faktoren, welche wiederum in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe umfasst Faktoren, die bei entsprechender Induktion neu synthetisiert werden. Zur zweiten Gruppe gehören Transkriptionsfaktoren, die in einer inaktiven Form in der Zelle vorkommen und erst nach dem Einwirken eines spezifischen Stimulus enzymatisch in die aktive Form umgewandelt werden. Die Aktivierung dieser Proteine geschieht sehr schnell, da sie nicht zuerst synthetisiert werden müssen. NF- κ B ist ein Mitglied dieser Gruppe.

2.1 Die Familie der NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteine

2.1.1 Die NF- κ B/Rel-Proteine

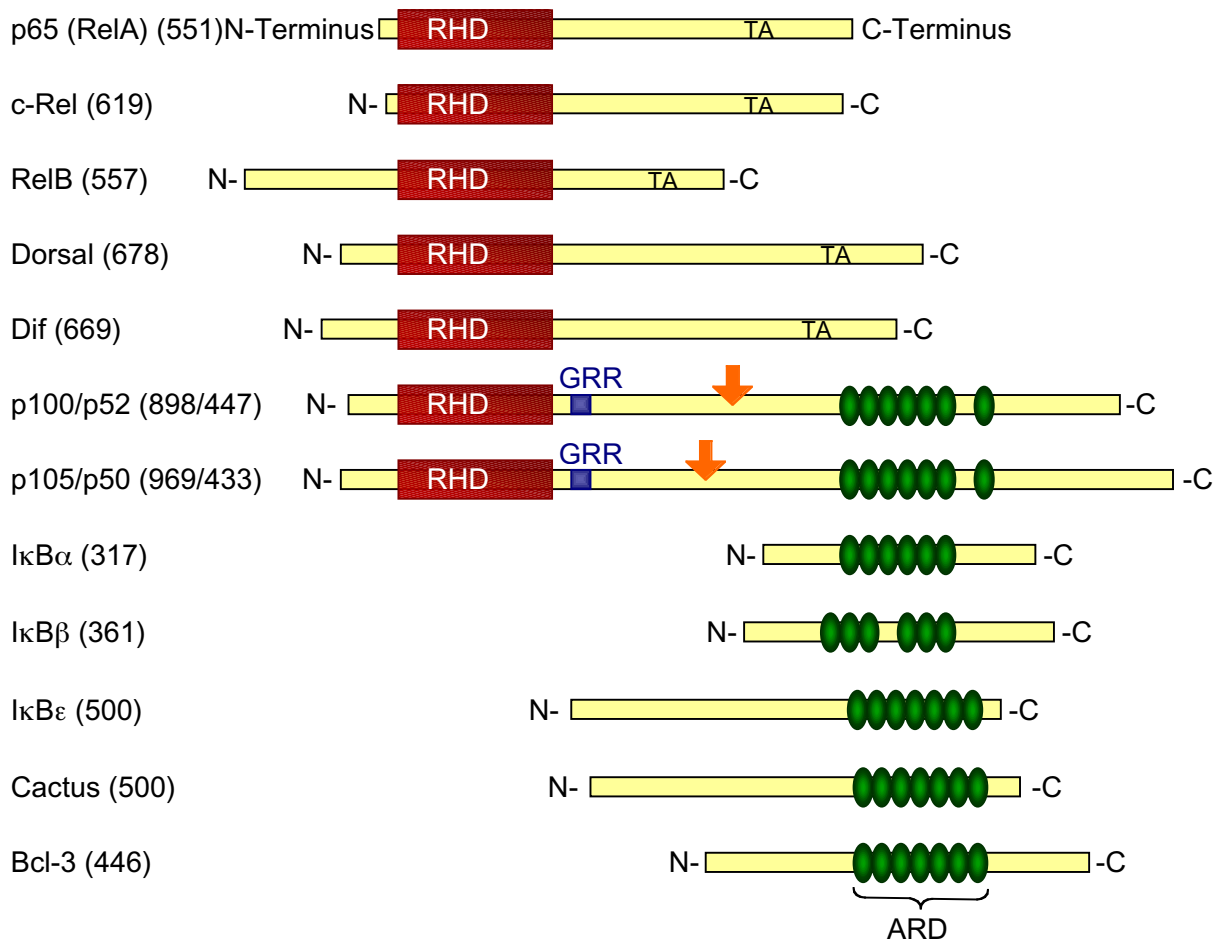
NF- κ B wurde zuerst in reifen B-Lymphozyten als ein nukleärer Faktor identifiziert, der an die 5'-GGGACTTTCC-3' DNS-Sequenz in der Enhancer-Region eines Immunglobulin-Gens (leichte Kette von Immunglobulin kappa) bindet (1). Er kommt in vielen Lebewesen von *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) bis zum Menschen vor und spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Lebensprozessen wie Entzündung, Immunantwort, Zellwachstum, Entwicklungsprozessen und Apoptose (programmierter Zelltod) (2). Dieser Transkriptionsfaktor kann einerseits dem Organismus helfen, mit schädlichen Umwelteinflüssen fertigzuwerden. Andererseits ist er jedoch auch in Tumorzellen aktiv und ermöglicht deren schnelles Wachstum (3). Ausserdem können gewisse Viren mit Hilfe von NF- κ B die Expression ihrer eigenen Gene aktivieren (4). Für viele Viren wurde zudem nachgewiesen, dass sie die Regulationsmechanismen der NF- κ B-Aktivität beeinflussen (5-7).

In seiner DNS bindenden Form bildet NF- κ B immer Dimere aus zwei Proteinen der NF- κ B/Rel-Familie. In Säugetierzellen kommen folgende fünf Rel-Proteine vor: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), c-Rel, p65 (RelA) und RelB (8, 9) (Figur 1). Drei Rel-Proteine sind bei *D. melanogaster* bekannt: Dorsal, Drosophila Immunitätsfaktor (Dif) und Relish. Dorsal ist ein mütterliches Protein, das die dorsoventrale Polarität des *Drosophila*-Embryos determiniert (10). Dif

spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Erregern, wie zum Beispiel Bakterien. Auch Relish ist ein zentraler Faktor bei der Kontrolle der Immunabwehr, allerdings nur bei der humoralen, nicht jedoch bei der zellulären (11).

In Säugetierzellen existieren viele verschiedene Homo- und Heterodimere der NF- κ B/Rel-Proteine. p65/p50 ist der am besten untersuchte Dimerkomplex und derjenige, der in den meisten Zelltypen am häufigsten vorkommt (12). Sowohl für p50 als auch für p65 wurde gezeigt, dass sie nicht nur als Hetero- sondern je auch als Homodimere an NF- κ B-Bindungssequenzen auf der DNS binden (13). Grundsätzlich sind viele Dimerkombinationen denkbar. Ob alle möglichen Kombinationen natürlicherweise vorkommen, welche Funktionen sie in welchen Zellen übernehmen und welche Bedeutung diese für den gesamten Organismus haben, ist noch nicht restlos geklärt.

Figur 1 Die NF- κ B/Rel-Familie



Schematische Darstellung der NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteine. In Klammern sind jeweils die Längen der Proteine in Aminosäuren angegeben. Die roten Boxen veranschaulichen die Rel Homologiedomänen (RHD). Die Ankyrin Repetitionen werden durch grüne Ovale dargestellt. Die orangen Pfeile markieren den Ort der Proteolyse bei der Entstehung von p50 und p52 aus ihren Vorläuferproteinen. GRR = Glycin-reiche Region von p100 und p105, TA = Transaktivierungsdomäne, ARD = Ankyrin Repetitionsdomäne.

Alle Proteine aus der NF- κ B/Rel-Familie zeigen eine starke Übereinstimmung der Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende. Diese etwa 300 Aminosäuren lange Sequenz nennt man Rel Homologiedomäne (RHD) (Figur 1). Sie enthält einen Dimerisationsbereich, eine DNS-bindende Sequenz und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Der Dimerisationsbereich liegt zwischen 200 und 300 Aminosäuren vom N-terminalen Ende entfernt. Bei einer natürlich vorkommenden Splicing-Variante von p65, p65 Δ , sind in der Dimerisationssequenz 10 Aminosäuren deletiert und sie kann aus diesem Grunde keine Dimere mit p50 bilden (8). Trotzdem kann sie immer noch mit p65 Komplexe bilden. Allerdings ist die DNS-Bindungs-kapazität des p65/p65 Δ -Komplexes stark reduziert.

RelB, c-Rel, p65, Dorsal und Dif enthalten C-terminal der RHD eine Transaktivierungsdomäne (TA). Diese TA fehlt bei p50 und p52. Dies ist auch der Grund, warum p50 (wie auch p52) allein im allgemeinen kein Aktivator von NF- κ B-abhängigen Genen ist, sondern im Gegenteil sogar ein Inhibitor sein kann (14, 15). RelB hingegen hat zwei Transaktivierungsdomänen, eine in der RHD, die andere C-terminal. RelB kann mit p50 und p52 dimerisieren, wobei die zwei TAs von RelB von entscheidender Bedeutung für die volle Aktivität dieser Dimere sind.

Als einziges Protein der NF- κ B/Rel-Familie verfügt p65 über eine C-terminale Leucin-reiche Region, die als nukleäre Exportsequenz (NES) dient. Mit deren Hilfe kann p65 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden (16). Das Protein c-Rel ist ein Protoonkogen, das zum Beispiel durch chromosomale Translokation in ein Onkogen umgewandelt werden kann (8).

p50 und p52 entstehen im Unterschied zu p65, RelB und c-Rel aus Vorläuferproteinen (p105 beziehungsweise p100) (8). Durch proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine an bestimmten Stellen entstehen Spaltprodukte, wobei die N-terminalen Teile p50 beziehungsweise p52 entsprechen. p105 und p100 enthalten direkt C-terminal der RHD eine Glycin-reiche Region (GRR). Diese spielt bei der proteolytischen Spaltung eine wichtige Rolle.

2.1.2 Die I κ B-Proteine

Wenn kein spezifischer Stimulus auf die Zelle einwirkt, wird NF- κ B durch Inhibitorproteine (I κ B) inaktiviert, indem er mit diesen Komplexe bildet. Die I κ B-Familie umfasst I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B ξ (17), Bcl-3 und die Vorläufer von p50 und p52 (p105 beziehungsweise p100) (12). Die wichtigsten I κ B-Vertreter sind I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ . Auch *D. melanogaster* besitzt ein I κ B-Analog (Cactus).

Alle I κ B-Proteine enthalten mehrere Ankyrin Repetitionen, welche die Ankyrin Repetitionsdomäne (ARD) bilden (Figur 1). Eine Ankyrin Repetition ist 33 Aminosäuren lang. Diese Repetition wurde ursprünglich im Protein Ankyrin gefunden, dessen Funktion in der Zelle es ist, als Linkerprotein Membranproteine mit Bestandteilen des Zytoskelettes zu verbinden. ARDs wurden in unzähligen Proteinen wie zum Beispiel in Zellmembran-Kanälen, Enzymen,

Toxinen, Signalkaskaden-Proteinen und Transkriptionsfaktoren gefunden. Durch die spezifische Sekundärstruktur der Ankyrin Repetitionen werden gewisse Aminosäuren an der Oberfläche der Proteine exponiert, wodurch Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht werden (18). Die ARD der I κ B-Proteine vermittelt deren Bindung an die RHD der NF- κ B/Rel-Proteine. Durch diese Bindung wird auch das sich in der RHD befindende NLS bedeckt, wodurch der NF- κ B/I κ B-Komplex im Zytoplasma zurückgehalten wird (19, 20).

Nur I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ besitzen die für die Stimulus-induzierte Degradation notwendige N-terminale regulatorische Region (12). Die Degradation der I κ B-Proteine ist ein entscheidender Vorgang bei der NF- κ B-Aktivierung (siehe Kapitel „Die Aktivierungskaskade von NF- κ B“).

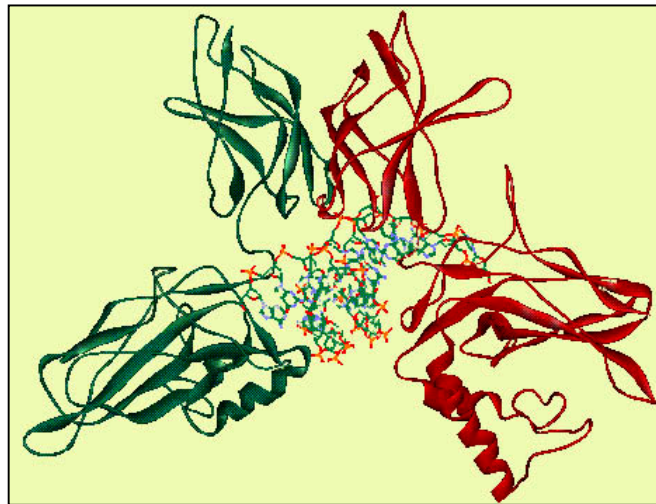
Die Expression aller I κ B-Proteine, ausser jener von I κ B β , wird durch NF- κ B gesteuert (12). I κ B α und I κ B β assoziieren hauptsächlich mit Dimeren, die entweder c-Rel oder p65 enthalten. I κ B γ entspricht den C-terminalen 607 Aminosäuren von p105 und entsteht aus dem gleichen Gen, das auch für p105 kodiert. Dieses Gen besitzt eine alternative Transkriptions-Startsequenz in seinem Intron (21). I κ B γ kommt wahrscheinlich nur in B-Lymphozyten von Mäusen vor. Die Vorläuferproteine p100 und p105 können mit anderen NF- κ B-Untereinheiten dimerisieren und so deren Transport in den Zellkern und die Bindung an die DNS verhindern. p105 kann trotz der Anwesenheit einer RHD in seinem N-terminalen Ende nicht an die DNS binden. Nur wenn die ARD deletiert oder mutiert ist, wird eine DNS-Bindung möglich. Die ARD hemmt folglich durch intramolekulare Wechselwirkungen die Aktivität der RHD im gleichen Protein (22). p100 kann einen trimerischen Komplex mit NF- κ B-Dimeren bilden. Bcl-3 ist wie I κ B α befähigt, in den Zellkern einzutreten, und wirkt gebunden an p50- oder p52-Homodimere als Aktivator der Transkription. Dieses Protein ist also eher ein Aktivator, denn ein Inhibitor der NF- κ B-Aktivität (23). Entsprechend dieser Funktion wird durch Bcl-3 die NLS-Region von p50 oder p52 nicht verdeckt (24).

2.2 Die dreidimensionale Struktur von NF- κ B

Von NF- κ B ist vor allem die dreidimensionale Struktur des N-terminalen Endes mit der RHD gut untersucht, weil die Tertiärstruktur des C-terminalen Endes mit der TA *in vitro* instabil ist. Die verschiedenen an die DNS gebundenen NF- κ B-Dimere haben eine schmetterlingsartige Struktur (25, 26, Figur 2). Die RHD faltet sich dabei an zwei Stellen so auf, dass sich eine zweiarmige Struktur ähnlich wie bei den Immunglobulinen ergibt. Beide Falten haben Kontakt zur DNS und sind durch ein zehn Aminosäuren langes Verbindungsstück miteinander verbunden (13). Während die N-terminale Falte für die Sequenz-spezifische Erkennung der DNS verantwortlich ist, enthält die C-terminale Falte den Dimerisationsbereich der RHD. Die Dimerisation von zwei NF- κ B/Rel-Proteinen kommt durch hydrophobe Interaktionen entlang

einem dreisträngigen β -Faltblatt des einen Proteins mit einer entsprechenden Struktur des anderen Proteins zustande. Die Ankyrin Repetitionsdomäne von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bildet eine α -Helix, die mit der C-terminalen Falte der RHD eine Bindung eingehen kann. Auf die Bedeutung dieser Interaktion wird im Kapitel „Die Aktivierungskaskade von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ “ näher eingegangen.

Figur 2 Die dreidimensionale Struktur von an die DNS gebundenem p65/p50



Darstellung der schmetterlingsartigen Struktur von an die DNS gebundenem p65/p50-Heterodimer (Abbildung aus Molecular Biology Web Book, www.web-books.com/MoBio)

2.3 Aktivatoren und Inhibitoren von $\text{NF-}\kappa\text{B}$

Es gibt viele verschiedene extra- und intrazelluläre Stimuli, welche die Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ bewirken (Tabelle 1). Häufige Stimuli, die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aktivieren, sind Infektionen mit Bakterien oder Viren. Bakterien besitzen mehrere Oberflächenantigene, welche im infizierten Organismus eine Immunantwort auslösen. Auf der Zellmembran von gewissen Säugetierzellen werden Rezeptoren exprimiert, welche entweder Peptidoglykane von grampositiven oder Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien erkennen (27-29). Da sich Viren im Gegensatz zu den meisten Bakterien obligat intrazellulär vermehren, werden im Laufe der Virusreplikation virale Proteine im Zytoplasma produziert. Diese Proteine können auf verschiedenen Wegen zelleigene Regulationssysteme, wie etwa die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Aktivierungskaskade, beeinflussen (5, 7, 30-32).

Viele Entzündungsmediatoren und Zytokine, wie zum Beispiel verschiedene Interleukine (IL), Leukotriene und die Tumor Nekrose Faktoren α und β ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$), aktivieren über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Nach dem gleichen Prinzip aktivieren gewisse Wachstumsfaktoren die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalkaskade. Dazu gehören der Granulozyten-

Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) und das Insulin (33). Zusätzlich sind auch physiologische Mediatoren wie der plättchenaktivierende Faktor (PAF), Erythropoetin (EPO), Bradykinin oder Angiotensin II in der Lage NF- κ B zu aktivieren (34-38).

UV-Strahlung und oxidativer Stress, zum Beispiel durch Ischämie oder durch Oxidantien wie Sauerstoff und Wasserstoffperoxid verursacht, können NF- κ B durch einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus aktivieren (39-42). Diese Einflüsse führen zur Produktion von reaktiven Sauerstoff-Radikalen und zum Verbrauch der Reserven an reduziertem Glutathion. In der Folge reichert sich in der Zelle oxidiertes Glutathion an. Diese Vorgänge führen ebenfalls zur Aktivierung der NF- κ B-Kaskade. Es wurde ausserdem gezeigt, dass Zigarettenrauch über den oben genannten Weg der Radikalbildung NF- κ B aktivieren kann (43).

Tabelle 1 Aktivatoren von NF- κ B

Entzündungsmediatoren und Zytokine Leukotriene TNF α , TNF β IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 Aktivatoren der Protein-kinase C Phorbol-Ester Plättchenaktivierender Faktor Wachstumsfaktoren GM-CSF G-CSF M-CSF Insulin	Bakterien und Viren diverse grampositive (Peptidoglykan) und gram-negative Bakterien (LPS) Rhinovirus Influenzavirus Adenovirus Papillomavirus Menschliches Immundefizienz-Virus Immunrezeptoren T-Zell Rezeptor MHC Klasse I und II IL-2 Rezeptor	Physiologische Mediatoren Erythropoetin Bradykinin Angiotensin II Chemische und physikalische Einflüsse UV-Strahlung Hypoxie Radikale Oxidantien Wasserstoffperoxid Ozon Sauerstoff Allergene
---	--	--

(modifiziert nach Rahman, 1998 (44))

Die Aktivität von NF- κ B wird aber nicht nur durch Aktivatoren, sondern auch durch Inhibitoren reguliert. Einige Beispiele von Inhibitoren sind Glukokortikosteroide, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, Gliotoxin von *Aspergillus fumigatus*, Antioxidantien wie z.B. Glutathion, Vitamin E oder Thioredoxin, entzündungshemmende Stoffe (Acetylsalicylsäure, Cyclosporin A), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und viele mehr (45-52). Diese Inhibitoren können die Aktivierungskaskade von NF- κ B prinzipiell auf allen Stufen unterbrechen (siehe Kapitel „Die Aktivierungskaskade von NF- κ B“). Viele Inhibitoren von NF- κ B verhindern entweder die Degradation von I κ B α oder induzieren die Neusynthese von I κ B α .

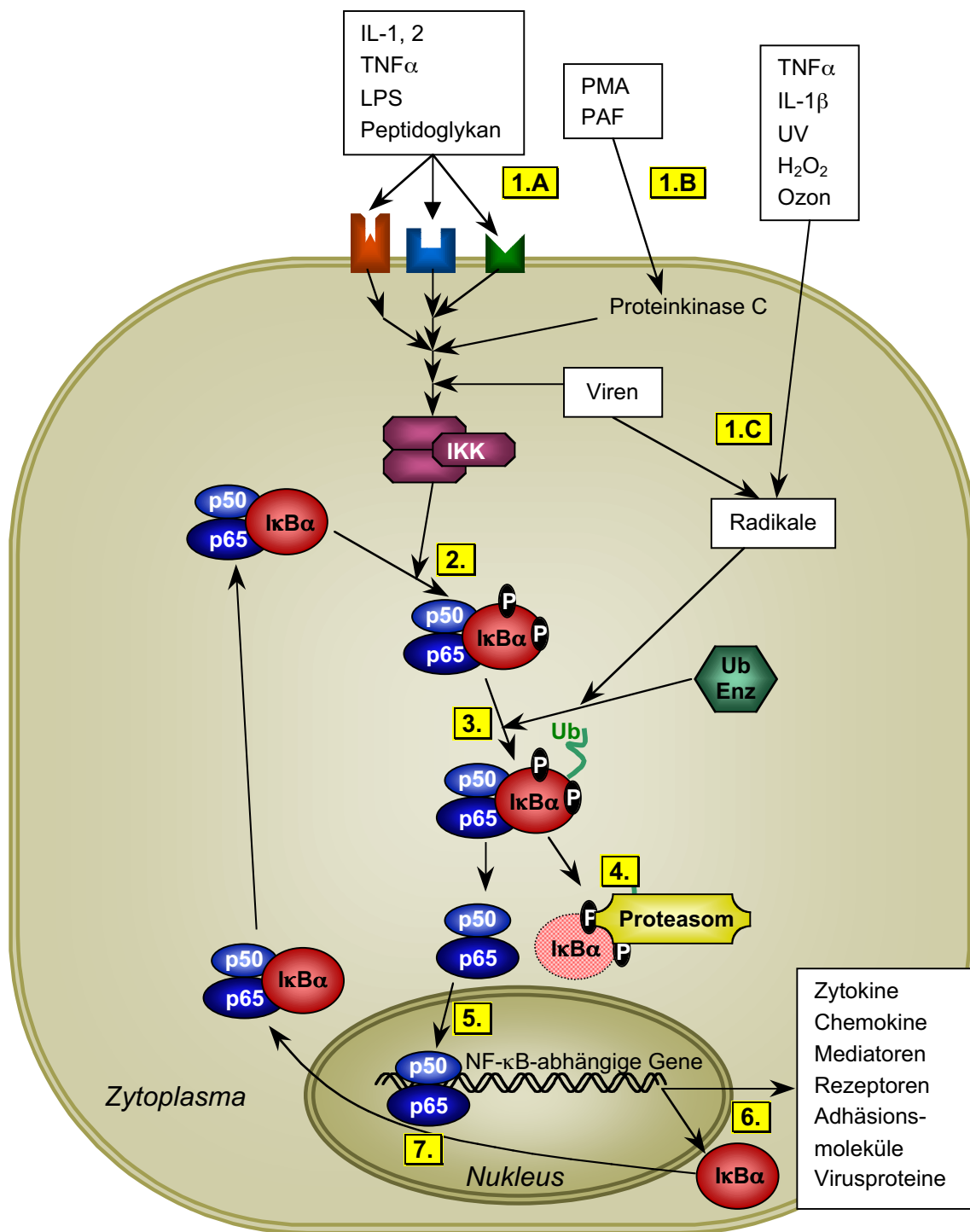
2.4 Die Aktivierungskaskade von NF- κ B

Die Aktivität von NF- κ B wird in erster Linie durch seine Lokalisation in der Zelle (Zytoplasma oder Zellkern) kontrolliert (12). Heute unterscheidet man zwei Arten von Aktivierungskaskaden, welche zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern führen: Den klassischen Aktivierungsweg (canonical pathway) und den nicht-klassischen Aktivierungsweg (noncanonical pathway) (53). Diese beiden Aktivierungswege unterscheiden sich voneinander sowohl in der Art der sie induzierenden Stimuli, als auch in den an der Signalkaskade beteiligten NF- κ B/Rel- beziehungsweise anderen Proteinen.

Beim klassischen Aktivierungsweg (Figur 3) wird inaktiver NF- κ B (p65/p50) im Zytoplasma angereichert, indem er an das Inhibitorprotein I κ B α bindet. Dieser NF- κ B/I κ B α -Komplex ist nicht in der Lage in den Zellkern zu translozieren, da das NLS von NF- κ B durch I κ B α verdeckt ist. Die signalbedingte Degradation von I κ B α löst die Translokation von NF- κ B in den Zellkern aus. Die I κ B α -Degradation ist der Schlüsselprozess in der Enzymkaskade und läuft hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschliesslich, im Zytoplasma ab (54).

Viele verschiedene Signalkaskaden können zur Degradation von I κ B α führen. Obwohl eine Zelle auf sehr viele Stimuli reagieren kann und muss, ist das Grundprinzip vieler Signalkaskaden gleich. Ein exogener Stimulus, sei dies ein bakterielles Produkt, ein Zytokin oder ein Wachstumsfaktor, bindet an seinen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dadurch wird im Rezeptor eine Konformationsänderung bewirkt, und auf der Innenseite der Zellmembran werden Proteinkinasen aktiviert. Diese lösen eine Phosphorylierungskaskade aus, während der in mehreren Schritten weitere Proteinkinasen durch Phosphorylierung aktiviert werden. Auch der klassische Aktivierungsweg von NF- κ B basiert auf einer solchen Phosphorylierungskaskade, während welcher der I κ B α -Kinase-Komplex (IKK) phosphoryliert und damit aktiviert wird (55). Dieser besteht aus drei Untereinheiten, IKK α , IKK β und IKK γ (85 kDa, 87 kDa und 48 kDa). IKK α und IKK β zeigen eine grosse strukturelle Homologie, denn sie stimmen in etwa der Hälfte der Aminosäuresequenz überein (12). Diese zwei Proteine dienen als katalytische Untereinheiten des IKK. Die dritte Komponente, IKK γ oder NEMO (NF- κ B essential modulator), dient hingegen als regulatorische Untereinheit und besitzt keine Kinase-Aktivität. Durch gewisse Stimuli wie PMA (Phorbol-Myristat-Azetat) und LPS kann eine andere IKK-verwandte Kinase aktiviert werden, die sogenannte IKK ϵ /IKK ι (56-58). Die genaue Enzymkaskade bei diesen Stimuli ist aber noch nicht untersucht. Wurde im Verlauf der Aktivierungskaskade die Untereinheit IKK β des Heterotrimers IKK phosphoryliert, so kann I κ B α durch IKK an den Aminosäuren Serin 32 und Serin 36 phosphoryliert werden (59). Interessanterweise bevorzugt IKK I κ B α /NF- κ B-Komplexe gegenüber freiem I κ B α , so dass sich neu synthetisiertes I κ B α in der Zelle anreichern kann, auch wenn die Kinase noch aktiv ist.

Figur 3 Der klassische Aktivierungsweg von NF- κ B



Klassischer Aktivierungsweg von NF- κ B (dargestellt in einer Säugetierzelle): Gewisse Aktivatoren (IL, TNF α , LPS, Peptidoglykan) binden an Rezeptoren auf der Zellmembran und aktivieren dadurch eine Phosphorylierungskaskade im Zytoplasma, an deren Ende IKK aktiviert wird (1.A). Andere Stimulatoren (PMA, PAF) aktivieren über die intrazytoplasmatische Proteinkinase C die Phosphorylierungskaskade (1.B). I κ B α wird in der Folge phosphoryliert (2.) und ubiquitiniert (3.). Einige Aktivatoren (z.B. Viren, H₂O₂, Ozon, UV-Strahlung) wirken über die Bildung von Radikalen, welche direkt eine Ubiquitinierung von I κ B α auslösen (1.C) (Ub = Ubiquitin, Ub Enz = ubiquitinierende Enzyme). Das ubiquitinierte I κ B α wird vom 26S-Proteasom proteolytisch verdaut (4.). NF- κ B transloziert in den Zellkern, bindet an spezifische Promotorsequenzen (5.) und aktiviert so verschiedene Gene, u.a. jenes von I κ B α (6.). Neu synthetisiertes I κ B α beendet möglicherweise die Aktivität von NF- κ B, indem es diesen von der DNS entfernt und ins Zytoplasma transportiert (7.).

Die anschliessende Ubiquitinierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ setzt voraus, dass die Serine 32 und 36 von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphoryliert sind (60). An der Ubiquitinierung sind drei Enzyme beteiligt: Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1), die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) und die Protein-Ubiquitin Ligasen (E3) (12). Zusammen katalysieren sie die kovalente Bindung von Ubiquitin an Lysin-Reste von Proteinen. Bei $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sind Lysin 21 und Lysin 22 von Bedeutung für die Ubiquitinierung (61). Durch Anlagerung von weiteren Ubiquitin-Molekülen an das bereits gebundene Ubiquitin entstehen Polyubiquitin-Ketten. Während phosphoryliertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ an den NF- κ B-Komplex gebunden bleibt, dissoziiert ubiquitiniertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ von NF- κ B (60). Mit Ubiquitin-Ketten markierte Proteine werden vom 26S-Proteasom erkannt und proteolytisch verdaut. Das Ubiquitin Proteolyse-System hat zur Aufgabe, alte oder defekte Proteine und überzählige Transkriptionsfaktoren, Onkoproteine, Signaltransduktoren und Zellzyklusregulatoren zu beseitigen (12). Das 26S-Proteasom ist auch für die Degradation von ubiquitiniertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ verantwortlich.

Die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ erfolgt bereits wenige Minuten nach dem Auftreffen des NF- κ B-aktivierenden Signals auf die Zellmembran (12). Als Folge davon wird NF- κ B frei, kann dank seinem NLS in den Zellkern translozieren, wo er sich anreichert und an die NF- κ B-Bindungssequenzen auf der DNS binden kann. Diese kommen in Promotoren von verschiedenen Genen vor. Ein Promotor ist der einem Gen vorgeschaltete Regulator der Transkription desselben Gens. Er enthält DNS-Bindungssequenzen (cis-Elemente) für verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren der Transkription (trans-Elemente). Je nachdem welche Proteine an die Promotor-Region auf der DNS binden, wird das dazugehörige Gen transkribiert oder dessen Transkription verhindert. NF- κ B ist ein solcher Aktivator und veranlasst durch seine Bindung an entsprechende Promotoren die Transkription der entsprechenden Gene.

$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ spielt nicht nur bei der Hemmung, sondern möglicherweise auch bei der Beendigung der NF- κ B-Aktivität eine entscheidende Rolle (12, 62). NF- κ B stimuliert unter anderem auch die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}$ Genen. Neu synthetisiertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ könnte in den Zellkern eintreten, NF- κ B binden und die Dissoziation von NF- κ B von der DNS bewirken. Dank der nukleären Exportsequenz (NES) von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, welche sich im N-terminalen Ende befindet (63), kann der Komplex zurück ins Zytoplasma transportiert werden. Dieser Mechanismus würde eine strenge Autoregulation der NF- κ B Aktivität ermöglichen und im Anschluss an eine Stimulation der Zelle überschüssende, für die Zelle und den Organismus potentiell schädliche Reaktionen verhindern (negativer Feedback-Mechanismus). Die Bindung an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist jedoch nicht der einzige Mechanismus, durch den die Lokalisation von NF- κ B in der Zelle reguliert wird. Auch in Abwesenheit von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kann p65 dank seiner NES kontinuierlich vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden (16). Die Translokalisierung von NES enthaltenden Proteinen erfordert die Anwesenheit des Rezeptor-Proteins CRM1 (63). Wenn $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fehlt,

gelangt allerdings auch fortwährend p65 in den Zellkern, da das NLS nicht verdeckt ist. p50 kann den Export von p65 verhindern, indem es als Inhibitor der NES von p65 wirkt, so dass sich p65/p50-Heterodimere im Zellkern anreichern, auch wenn wenig I κ B α vorhanden ist.

Der nicht klassische Aktivierungsweg wird zum Beispiel durch Lymphotoxin β stimuliert. Im Verlaufe dieser Aktivierungskaskade wird die Untereinheit IKK α des IKK-Trimers durch die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) phosphoryliert. IKK wird dadurch aktiviert und kann p100 (das Vorläuferprotein von p52) phosphorylieren, welches im Zytoplasma als Komplex mit RelB vorliegt. In der Folge wird p100 zu p52 prozessiert, der p52/RelB-Komplex kann in den Zellkern translozieren und an NF- κ B-abhängige Promotorsequenzen binden (53).

Es ist noch nicht restlos geklärt, welche Mechanismen notwendig sind, damit NF- κ B durch die Bindung an seine Promotorsequenz die Transkription des entsprechenden Gens initiieren kann. Bekannt ist, dass die Remodellierung des Chromatins in der Promotorregion und die Anwesenheit von Ko-Aktivatoren eine wichtige Rolle spielen. Einen Überblick über den aktuellen Wissensstand auf diesem Gebiet vermittelt die Übersichtsarbeit von Tian und Brasier, 2003 (64).

Je nach Stimulus, der auf die Zelle einwirkt, ist die aktivierte Enzymkaskade verschieden und es können so andere NF- κ B-Komplexe durch die Kaskade aktiviert werden, was schliesslich auch zur Transkription unterschiedlicher Gene führt. Gewisse Stimuli benötigen ganz spezifische Rezeptoren, die nur auf der Zellmembran von bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Am besten untersucht ist die Enzymkaskade bei der Stimulation durch TNF α , welches zur Aktivierung des klassischen Aktivierungsweges führt (55). Andere Stimuli aktivieren NF- κ B über die intrazelluläre Bildung von Sauerstoffradikalen. Dieser Mechanismus scheint in allen Zellen zu einer Aktivierung von NF- κ B zu führen. Die genaue Funktionsweise der NF- κ B-Stimulation durch Radikale ist noch nicht restlos geklärt.

2.5 Die Bedeutung von NF- κ B

Als Transkriptionsfaktor kann NF- κ B auf verschiedene physiologische und pathologische Prozesse Einfluss nehmen. Die Expression von zahlreichen Genen, welche für Proteine kodieren, die bei der Entzündung, der Immunantwort, der Krebsentstehung, der Apoptose und der Funktion von Neuronen eine wichtige Rolle spielen, wird durch NF- κ B reguliert. Durch die systematische Suche nach NF- κ B-abhängigen Promotoren wurde in neuester Zeit ein Fülle von Genen beschrieben, welche ebenfalls unter der Kontrolle von NF- κ B stehen (64). Über die Bedeutung der Regulationsmechanismen einiger dieser Gene ist jedoch wenig oder nichts bekannt. Drei Vorgänge, bei denen die Funktion von NF- κ B relativ gut erforscht ist, sollen in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden: Entzündung, Krebsentstehung und die Funktion von Neuronen.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von NF- κ B kann eine Entgleisung seiner Regulation bei Mensch und Tier zu unzähligen Krankheiten führen. Die Kenntnis der genauen Regulationsmechanismen von NF- κ B kann entscheidend dazu beitragen, die Pathogenese von verschiedenen Krankheiten auf zellulärer Ebene zu verstehen. Die gründliche Erforschung der Enzymkaskaden bei der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors wird zudem ermöglichen, dass man in naher Zukunft Medikamente entwickeln kann, welche in diese Kaskaden eingreifen.

2.5.1 NF- κ B und Entzündung

Viele Gene, welche bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen, werden durch NF- κ B aktiviert (Tabelle 2). Bei Entzündungen werden von Immunzellen verschiedene Botenstoffe produziert, welche den anderen Zellen im Organismus signalisieren, dass an einer bestimmten Stelle des Körpers eine Entzündung abläuft. Diese Mediatoren, Zytokine und Chemokine haben die Aufgabe, Entzündungszellen zum Wachstum anzuregen und sie an den Ort des Geschehens zu rekrutieren. NF- κ B stimuliert die Produktion von wichtigen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), sowie der Zytokine IL-1, IL-6, TNF α , Lymphotoxin und IFN- γ . Einige dieser Zytokine aktivieren ihrerseits NF- κ B, wodurch es zu einem positiven Feedback-Mechanismus kommt. Damit Entzündungszellen wie neutrophile und eosinophile Granulozyten und Lymphozyten vom Blut in den Entzündungsherd vordringen können, müssen sie an der Gefäßwand anhaften und zwischen den Endothelzellen durchtreten. Dabei helfen ihnen durch NF- κ B induzierte Adhäsionsmoleküle (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und E-Selektin) (65, 66). Entlang einem Konzentrationsgradienten von Chemokinen wandern die Entzündungszellen anschliessend zum Entzündungsherd. Auch die Produktion einiger dieser Chemokine wird durch NF- κ B gesteuert. Zusätzlich werden folgende Enzyme durch NF- κ B induziert, welche die Bildung von Entzündungsmediatoren katalysieren: Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase 2 (COX-2), die 5-Lipoxygenase, die 12-Lipoxygenase und die zytosolische Phospholipase A₂. Die von diesen Enzymen produzierten Entzündungsmediatoren können unter anderem Blutgefässe erweitern, um die Durchblutung des betroffenen Gebietes zu erhöhen.

Bei zahlreichen akuten und chronischen entzündlichen Krankheiten spielt NF- κ B eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel bei ARDS (acute respiratory distress syndrome), Asthma, RAO (recurrent airway obstruction), rheumatischer Arthritis, Arteriosklerose und bei IBD (inflammatory bowel disease) (67-75). Auch bei der Glomerulonephritis ist die NF- κ B-Aktivität von entscheidender Bedeutung (76, 77). Viele entzündungshemmende Stoffe, wie Acetylsalicylsäure, ein nichtsteroidaler Entzündungshemmer, und Dexamethason, ein Glukokortikosteroid, hemmen die Aktivität von NF- κ B (45, 46, 50, 51).

Tabelle 2 Durch NF- κ B regulierte Proteine, die bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielen

Zytokine TNF α , IFN- γ IL-1 β , -2, -3, -6, -12 Lymphotoxin	Chemokine IL-8 MIP-1 α MCP-1 Gro- α , - β , - γ Eotaxin RANTES	Entzündungsmediatoren iNOS COX-2 5-Lipoxygenase 12-Lipoxygenase Zytoplasm. Phospholipase A2 C-reaktives Protein
Wachstumsfaktoren GM-CSF G-CSF M-CSF	Immunrezeptoren IL-2 Rezeptor (α -Kette) T-Zell Rezeptor (β -Kette) PAF-Rezeptor CD11b, CD48	Komplementfaktoren B, C3
Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 E-Selektin		Protoonkogene p53, c-myc, ras

(modifiziert nach Rahman, 1998 (44))

2.5.2 NF- κ B und Neoplasie

Bei der Entstehung und Entwicklung von Neoplasien werden drei Phasen unterschieden: Initiation, Promotion und Metastasenbildung. NF- κ B reguliert mehrere Gene, die auf die Promotion und die Metastasierung von Tumoren einen Einfluss haben (siehe unten). Zur Promotion gehören unter anderem klonales Wachstum, Entwicklung, Dedifferenzierung, Angiogenese, Adhäsion und der Abbau der extrazellulären Matrix (78).

Damit Tumorzellen unbegrenzt wachsen können, muss die Apoptose gehemmt werden. NF- κ B ist sowohl ein Initiator als auch ein Hemmer der Apoptose, wobei die hemmende Wirkung wahrscheinlich überwiegt. In RelA^{-/-}-Mäusen kommt die antiapoptotische Wirkung dieses Proteins besonders deutlich zum Ausdruck. Diese Mäuse sterben im Embryonalstadium, weil die Leberzellen massenhaft Apoptose begehen (79). Die entgegengesetzte Wirkung von NF- κ B kann zum Teil zellspezifisch oder auch abhängig vom induzierenden Signal oder vom Entwicklungsstadium der Zelle sein. Eine antiapoptotische Rolle von NF- κ B wurde in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, Neuronen, Osteoklasten und glat-

ten Muskelzellen nachgewiesen (80-86). Als Initiator der Apoptose wirkt NF- κ B in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Neuronen und Endothelzellen (87-92). Es konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B in verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel T-Zell-Lymphosarkom, Melanom, Pankreas-Tumor, Blasenkrebs und Brustkrebs, eine antiapoptotische Funktion ausübt (93-96).

Die schnelle Vermehrung der Krebszellen führt im Tumor intermittierend zu Hypoxie, weil die bestehende Blutversorgung für die rasch wachsende Zellzahl nicht mehr genügt. Da Sauerstoff für das Zellwachstum aber essentiell ist, muss der Tumor chemotaktische Signale wie Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren, um die Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) anzuregen. Viele dieser Proteine werden durch NF- κ B reguliert, der wie im Kapitel „Aktivatoren und Inhibitoren von NF- κ B“ erläutert durch Hypoxie aktiviert wird (97). Zwei Beispiele für solche NF- κ B-abhängige Angiogenese-anregende Proteine sind VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und MCP-1 (Monozyten-attrahierendes Protein 1) (98, 99).

Zur Metastasierung von Tumoren müssen Krebszellen sowohl in Blutgefäße hinein, als auch wieder aus diesen heraus wandern können, um in andere Bereiche des Körpers zu gelangen. Diese Eigenschaft, die Wand von Blutgefäßen passieren zu können, wird durch spezifische Moleküle vermittelt. Dazu gehören etwa ICAM-1 und VCAM-1, welche als Antwort auf eine NF- κ B-Aktivierung exprimiert werden (65, 66).

In vielen Tumoren wie zum Beispiel B- und T-Zell-Lymphosarkomen, Blasenkrebs, Brustkrebs, Schilddrüsenkrebs, Lungenkrebs und Prostatakrebs ist NF- κ B konstitutiv aktiviert (96, 100-104). Der Sinn dieser permanenten Aktivierung besteht eventuell darin, die Apoptose der Krebszellen zu verhindern (101). Die molekularen Mechanismen, welche zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B in einer Zelle führen, sind erst teilweise bekannt. Das Fehlen von I κ B α oder die Expression von nicht funktionsfähigem I κ B α , wie sie in Hodgkin-Tumoren vorkommt (105), könnten zu einer solchen permanenten Aktivierung von NF- κ B führen. In Sertolizellen, Photorezeptorzellen und in einigen Neuronen ist NF- κ B hingegen physiologischerweise konstitutiv aktiviert.

2.5.3 NF- κ B und Neurone

NF- κ B/Rel-Komplexe kommen in allen wichtigen Zelltypen im Nervensystem vor, unter anderem in Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen und in Oligodendrozyten (106). Die Aktivierung von NF- κ B geschieht im Nervensystem grundsätzlich durch die gleichen Stimuli, wie in den anderen Körperzellen (Tabelle 1). Daneben spielen aber auch Nervensystem-spezifische Aktivatoren von NF- κ B eine Rolle. Dazu gehören Neurotrophin (NGF), Neurotransmitter (z.B. Glutamat), amyloid β -peptide (A β), β -amyloid precursor protein (β APP) und die Depolarisation der Zellwand (106). Auch durch die Signalübertragung zwischen Neuronen via Synapsen wird NF- κ B aktiviert. Diese ständige Stimulation der NF- κ B-Aktivierungskaskade könnte

ein Grund dafür sein, warum NF- κ B im Nervengewebe permanent eine vergleichsweise hohe Aktivität zeigt. NF- κ B reguliert in den Nervenzellen Gene, die unter anderem für TNF α und IL-6 kodieren, welche beide vor allem von Mikrogliazellen und Astrozyten produziert werden. Es werden aber auch Gene reguliert, welche die Information für β -amyloid precursor protein (ein Zytokin und neurotropher Faktor, der als Antwort auf Verletzungen synthetisiert wird), Calbindin-D28k (ein Kalzium-bindendes Protein), Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) und antiapoptotische Proteine enthalten. Daneben wird im Nervengewebe auch die Expression der meisten in Tabelle 2 aufgeführten Proteine durch NF- κ B reguliert. Eine sehr wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zelltod und -überleben übernimmt NF- κ B während der Entwicklung des Nervensystems (107). Ferner hat er auch Einfluss auf wichtige Funktionen des Gehirns wie Lernen und Erinnerung (108).

Neurodegenerative Erkrankungen sind weit verbreitete, chronisch-progrediente Krankheiten, welche zu gravierenden und schwer behandelbaren neurologischen Ausfallerscheinungen führen. Nicht nur bei der Alzheimer-Krankheit sondern auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie beispielsweise Parkinson- und Huntington-Krankheit und amyotrophe Lateralsklerose ist die NF- κ B-Aktivität erhöht (109-111). Ebenso ist bei der Multiplen Sklerose NF- κ B in den Gliazellen in hohem Grade aktiviert (112). Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Krankheit, das heisst Nervenzellen sterben in überdurchschnittlichem Masse ab. NF- κ B zeigte in den Zellen, welche in diesen neurodegenerativen Prozess involviert sind, eine erhöhte Aktivität. In diesen Zellen übernimmt der Transkriptionsfaktor wahrscheinlich eine neuroprotektive Rolle, das heisst er versucht den Untergang der Nervenzellen zu verhindern. Der früh auftretenden vererbbaaren Form der Alzheimer-Krankheit liegt eine Mutation im Presenilin-1-Gen zugrunde. Zellen, die das mutierte Presenilin-1 exprimieren, haben ein verändertes Schema der NF- κ B-Aktivierung. Auf eine oxidative Schädigung reagieren diese Zellen mit einer verstärkten frühen Aktivierung von NF- κ B, gefolgt von einer verlängerten Depression der Aktivität (113). In der langen Phase der Inaktivität von NF- κ B begeht die Zelle auf einen entsprechenden Stimulus hin Apoptose, da die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B fehlt.

3 Problemstellung und Projektbeschreibung

3.1 Problemstellung

Die NF- κ B/Rel-Familie wurde vor 17 Jahren zum ersten Mal beschrieben (1). Seitdem hat man die Funktionen der verschiedenen Proteine dieser Familie als Transkriptionsfaktoren und ihren Aufbau erforscht. So weiss man heute, wie die NF- κ B Aktivität in der Zelle prinzipiell reguliert und kontrolliert wird (Figur 2) und welche äusseren und inneren Faktoren über die Beeinflussung von NF- κ B eine Zellantwort bewirken. Im Anschluss an eine Stimulation der Zelle mit nachfolgender Aktivierung oder Inhibition von NF- κ B zeigen Säugetierzellen sehr unterschiedliche Reaktionen: Einige Immunzellen exprimieren spezielle Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche oder synthetisieren Signalmoleküle wie Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren, Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, Virenproteine werden produziert, die Zelle begeht Apoptose oder sie wird sogar zur Krebszelle. Welche Gene transkribiert werden, hängt entscheidend von der Art des NF- κ B-aktivierenden Stimulus, dem Zelltyp und dem Differenzierungsgrad der Zelle ab. Ein bestimmter stimulierender Faktor kann in zwei verschiedenen Zelllinien völlig unterschiedliche Wirkungen haben, obwohl er in beiden an denselben Rezeptor bindet. Andererseits können verschiedene Stimuli identische Reaktionen in einer Zelle auslösen. Die in Figur 2 beschriebene Aktivierungskaskade bietet zwar eine Erklärung für den zweiten Fall (gleiche Reaktion auf verschiedene Stimuli), nicht aber für den ersten (unterschiedliche Reaktionen auf gleiche Stimulation). Es wird deshalb vermutet, dass noch weitere Transkriptionsfaktoren und deren Aktivierungskaskaden an der Regulation dieser Gene beteiligt sind. Natürliche Promotoren enthalten zusätzlich zur NF- κ B-Sequenz Bindungsstellen für mehrere andere Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein 1 (AP1), Stimulierender Faktor 1 (Sp1), CAAT/Enhancer bindendes Protein (C/EBP) und CREB-bindendes Protein (CBP). Die Funktionsweise und Bedeutung dieser Faktoren sind noch nicht so umfassend charakterisiert wie jene von NF- κ B. Es ist bekannt, dass einige Transkriptionsfaktoren und Proteine der Transkriptionsmaschinerie ständig an Kern-Elemente des Promotors gebunden sind, andere hingegen erst nach einem bestimmten Stimulus an Enhancer-Sequenzen im Promotor rekrutiert werden und so die Transkription aktivieren (114). Zusätzlich können Transkriptionsfaktoren weitere Proteine durch Protein-Protein-Interaktionen an den Ort des Promotors rekrutieren. Die Gesamtheit der an eine bestimmte Promotorregion gebundenen Proteine nennt man Enhanceosom. Es wird vermutet, dass genau dieses Zusammenspiel von verschiedenen Transkriptionsfaktoren über die Aktivierung gewisser Gruppen von Genen und damit über die Reaktionsweise der Zelle auf einen bestimmten Stimulus entscheidet. Über die Dynamik der Enhanceosomen, das heisst über deren Zusammensetzung im Verlaufe einer Zellstimulation und über die Interaktionen zwi-

schen den verschiedenen beteiligten Proteinen, ist hingegen nur wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die Regulationsmechanismen von NF- κ B-abhängigen Genen anhand der Zusammensetzung der entsprechenden Enhanceosomen erforscht werden.

3.2 Projektbeschreibung

Das Dissertationsprojekt wurde in vier Teile mit den folgenden Zielen gegliedert:

1. In der Zellkultur wurden die optimalen Induktionsbedingungen für NF- κ B in verschiedenen menschlichen Zelllinien bestimmt.
2. Etablierung und Optimierung eines *in vitro* Versuchsystems auf der Basis eines Oligo-Pulldown Assays zur Isolierung von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen.
3. Im Anschluss an die Optimierung des Versuchsystems sollte die Zusammensetzung von isolierten Enhanceosomen systematisch in Abhängigkeit von der Zelllinie, der Zellstimulation und der Promotorsequenz der DNS-Sonde untersucht werden. Da beim Oligo-Pulldown Assay die Enhanceosomen *in vitro* an die Promotorsequenz (DNS-Sonde) rekrutiert werden, können diese Versuchsparameter unabhängig voneinander variiert werden. Zusätzlich kann die auf der DNS-Sonde enthaltene Promotorsequenz durch Punktmutationen nach Bedarf verändert werden. So sollten gezielte Mutationen der NF- κ B-Bindungssequenzen in den Promotor-Sonden die Identifikation jener Proteine ermöglichen, welche eine NF- κ B-abhängige Bindung zeigten. Diese sollten mittels Massenspektrometrie analysiert werden.
4. Zum Schluss sollte die Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Bindungssequenz mittels Oligo-Pulldown Assay und Western-Blot Analyse untersucht werden. Damit konnte ermittelt werden, ob sich das Versuchsystem des Oligo-Pulldown Assays in Kombination mit der Western-Blot Analyse dazu eignete, Protein-Protein-Interaktionen am Ort des Promotors eines Gens zu untersuchen.

4 Resultate

4.1 Induktion von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien

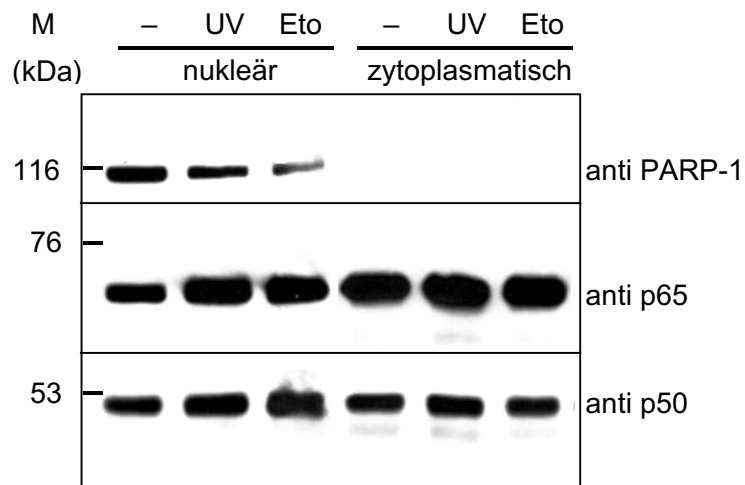
In einer eukaryotischen Zelle findet die Regulation der Transkription im Zellkern statt. Deshalb musste für die *in vitro* Rekonstitution von Enhanceosomen nukleärer Zellextrakt verwendet werden. Viele Transkriptionsfaktoren, welche an der Bildung von Enhanceosomen beteiligt sind, befinden sich nicht permanent im Zellkern. Sie können aber durch geeignete Stimulation der Zelle in den Zellkern translozieren. Auch NF- κ B gehört zu dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Für die Herstellung der nukleären Zellextrakte wurden folgende menschliche Zelllinien gewählt: HeLa, Jurkat, THP-1 und Hodgkin Zellen.

4.1.1 HeLa Zellen

Es ist bekannt, dass NF- κ B in HeLa Zellen durch ultraviolette Strahlung (UV) oder Etoposid induziert werden kann (M. Hottiger, pers. Mitteilung). Die Zellen wurden einer UV-Strahlenergie von 30 mJ/cm² exponiert und anschliessend für 2 h im Zellkulturschrank inkubiert. Für die Etoposid-Stimulation wurden dem Zellkulturmedium 20 μ M Etoposid zugegeben und die Zellen anschliessend während 2 h oder 4 h im Zellkulturschrank inkubiert. Im Anschluss an die Stimulation wurden nukleäre und zytoplasmatische Zellextrakte hergestellt. Zusätzlich wurden uninduzierte nukleäre und zytoplasmatische Zellextrakte vorbereitet. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot analysiert (siehe Kapitel „Methoden und Material“). Es wurden Antikörper gegen p65, p50 und PARP-1 verwendet.

Da PARP-1 (112 kDa) ausschliesslich im Zellkern vorkommt, konnte durch dessen Nachweis im nukleären nicht aber im zytoplasmatischen Zellextrakt nachgewiesen werden, dass bei der Präparation der Zellextrakte die Proteine des Zellkerns nicht ins Zytoplasma übergetreten waren. Durch den Vergleich der stimulierten Zellextrakte mit dem unstimulierten Extrakt konnte überprüft werden, ob p65 und p50 durch die Zellstimulation in den Zellkern translozierten. Nach der Stimulation der Zellen sowohl mit UV-Strahlung, als auch mit Etoposid erschienen p65 und p50 gegenüber uninduziertem Zellextrakt vermehrt im Zellkern, wobei die Zunahme von p65 deutlicher war als jene von p50 (Figur 4). Es machte jedoch keinen Unterschied, ob die Zellen während 2 h oder 4 h mit Etoposid inkubiert wurden (Resultate nicht gezeigt). Im zytoplasmatischen Zellextrakt kamen p65 und p50 in höheren Konzentrationen vor als im nukleären Zellextrakt und nach Stimulation der Zellen mit UV-Strahlung oder Etoposid war keine Abnahme nachweisbar. Das mässige Ansprechen der HeLa Zellen auf Stimulation sowohl mit UV-Strahlung als auch mit Etoposid, ist möglicherweise dadurch bedingt, dass NF- κ B bereits im unstimulierten Zustand in hoher Konzentration im Zellkern vorlag. Zudem war NF- κ B bereits im uninduzierten nukleären Zellextrakt in aktiver Form, da es an die κ B-Konsensus-Sonde binden konnte (Resultate nicht gezeigt).

Figur 4 Stimulation von HeLa Zellen mit UV-Strahlung oder Etoposid



Western-Blot Analyse von uninduzierten und mit UV-Strahlung (30 mJ/cm^2 , 2 h) beziehungsweise mit Etoposid ($20 \mu\text{M}$, 2 h) induzierten nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten von HeLa Zellen. Von den Zellextrakten wurden je $16 \mu\text{g}$ Protein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Für die Western-Blot Analyse wurden Antikörper gegen PARP-1 (oberste Membran), p65 (mittlere Membran) und p50 (unterste Membran) verwendet. M = Proteinmarker.

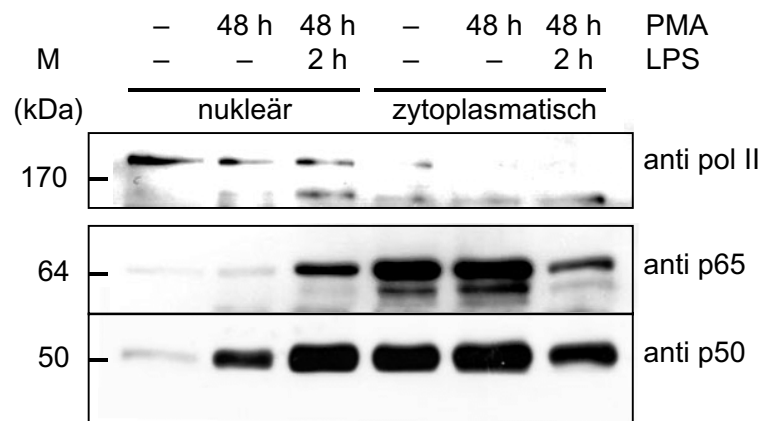
4.1.2 THP-1 Zellen

Von Monozyten ist bekannt, dass sie sich durch PMA-Stimulation zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren (115, 116). In Anlehnung an das Protokoll von Azuma, 2002 (116) wurden THP-1 Zellen während 48 h mit 200 nM PMA stimuliert. Die Makrophagen-ähnlichen Zellen hafteten an der Oberfläche der Zellkulturschalen. Um in diesen Zellen NF- κ B zu induzieren, wurden sie nach der 48-stündigen Stimulation mit 200 nM PMA zusätzlich mit $5 \mu\text{g}$ LPS pro ml Zellkulturmedium für weitere 2 h inkubiert (ebenfalls nach dem Protokoll von Azuma, 2002 (116)). Sowohl von den stimulierten wie auch von unstimulierten Zellen wurden nukleäre und zytoplasmatische Zellextrakte hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot analysiert (siehe Kapitel „Methoden und Material“). Es wurden Antikörper gegen p65, p50 und RNS-Polymerase II (pol II) verwendet.

Da pol II (215 kDa) ausschliesslich im Zellkern vorkommt, konnte durch deren Nachweis im nukleären nicht aber im zytoplasmatischen Zellextrakt nachgewiesen werden, dass bei der Präparation der Zellextrakte die Proteine des Zellkerns nicht ins Zytoplasma übergetreten waren. p65 und p50 kamen in der unstimulierten Zelle mehrheitlich im Zytoplasma vor (Figur 5). Die Signale dieser beiden Proteine waren im Zellkern ohne Stimulation der Zellen sehr schwach. Nach der Differenzierung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen durch PMA war im Vergleich zu den unstimulierten Zellen mehr p50 im Zellkern nachweisbar. Die Signale von p65 im Zellkern und von p65 und p50 im Zytoplasma unterschieden sich jedoch nicht

wesentlich von den Signalen im unstimulierten Zellextrakt. Nach zusätzlicher Stimulation der Makrophagen-ähnlichen Zellen mit LPS stieg die Konzentration von p50 im Zellkern weiter an. Auch die Menge an p65 nahm nun im Zellkern deutlich zu, wobei die Konzentrationen von p65 und p50 im Zytoplasma nach der LPS-Stimulation abnahmen. Die Resultate zeigten, dass NF- κ B mit LPS in Makrophagen-ähnlichen THP-1 Zellen induziert werden konnte.

Figur 5 Stimulation von THP-1 Zellen mit PMA oder mit PMA und LPS



Western-Blot Analyse von uninduzierten und mit PMA (200 nM, 48 h) beziehungsweise mit PMA / LPS (200 nM, 48 h / 5 μ g/ml, 2 h) stimulierten nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten von THP-1 Zellen. Von den Zellextrakten wurden je 16 μ g Protein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Für die Western-Blot Analyse wurden Antikörper gegen RNS-Polymerase II (pol II) (oberste Membran), p65 (mittlere Membran) und p50 (unterste Membran) verwendet.

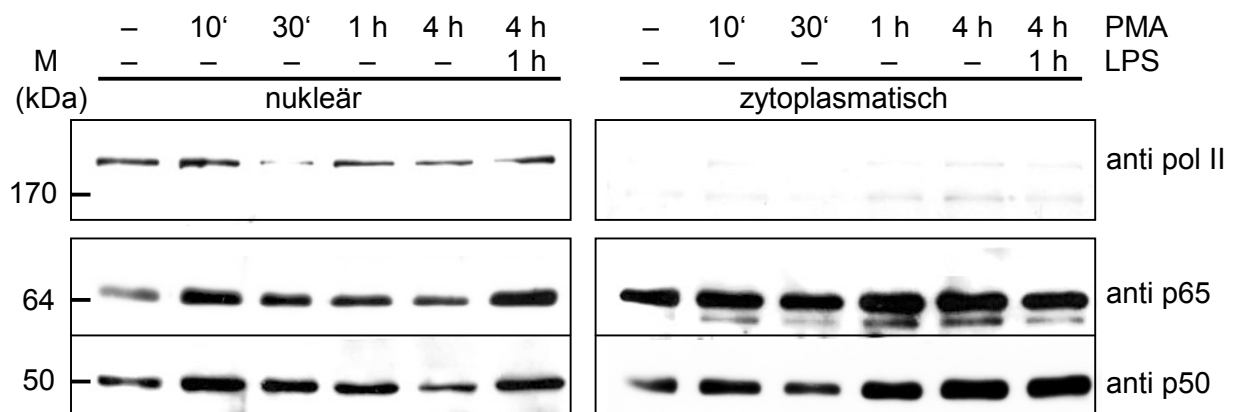
4.1.3 Jurkat Zellen

NF- κ B kann in Jurkat Zellen mit PMA induziert werden. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll nach jenem von Busuttil, 2002 (117) verwendet. Mit 20 ng PMA pro ml Zellkulturmedium (entspricht 32 nM) während 1 h, wie im Originalprotokoll beschrieben, konnte nur p50 nicht aber p65 induziert werden (Resultate nicht gezeigt). Deshalb wurde die PMA-Konzentration auf 100 nM erhöht. Mit dieser Konzentration wurden verschiedene Inkubationszeiten getestet (10 min, 30 min, 1 h und 4 h). In Anlehnung an die Stimulation der THP-1 Zellen wurden mit PMA stimulierte Jurkat Zellen (100 nM, 4 h) zusätzlich mit 5 μ g LPS pro ml Zellkulturmedium während einer weiteren Stunde inkubiert. Sowohl von den stimulierten wie auch von unstimulierten Zellen wurden nukleäre und zytoplasmatische Zellextrakte hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot analysiert (siehe Kapitel „Methoden und Material“). Es wurden Antikörper gegen p65, p50 und pol II verwendet.

Da pol II ausschliesslich im Zellkern vorkommt, konnte durch deren Nachweis im nukleären aber nicht im zytoplasmatischen Zellextrakt nachgewiesen werden, dass bei der Präparation

der Zellextrakte die Proteine des Zellkerns nicht ins Zytoplasma übergetreten waren. Im Zellkern konnte bereits nach 10 min PMA-Stimulation (100 nM) eine Zunahme von p65 und p50 beobachtet werden (Figur 6). Anschliessend nahm die Konzentration dieser Proteine kontinuierlich ab (bis 4 h), um dann nach LPS-Stimulation wieder stark anzusteigen. Im Zytoplasma waren im Verlauf der Stimulation nur geringe Änderungen der p65-Konzentration feststellbar, wohingegen die Menge an p50 stetig zunahm. Die höchsten Konzentrationen von p65 und p50 im Zellkern wurden nach 10 min PMA-Stimulation und nach 4 h PMA / 1 h LPS-Stimulation beobachtet.

Figur 6 Stimulation von Jurkat Zellen mit PMA allein oder mit PMA und LPS



Western-Blot Analyse von uninduzierten und mit PMA (100 nM; 10 min, 30 min, 1 h oder 4 h) beziehungsweise mit PMA / LPS (100 nM, 4 h / 5 µg/ml, 1 h) stimulierten nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten von Jurkat Zellen. Von den Zellextrakten wurden je 16 µg Protein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Für die Western-Blot Analyse wurden Antikörper gegen pol II (oberste Membran), p65 (mittlere Membran) und p50 (unterste Membran) verwendet.

4.1.4 Hodgkin Zellen

Die spezielle Eigenschaft der Hodgkin Zelllinie ist, dass in ihr NF-κB konstitutiv aktiviert ist und dadurch vermehrt im Zellkern vorkommt. Deshalb wurden Hodgkin Zellen nicht stimuliert. Bei der Präparation des nukleären Zellextraktes wurde zudem beobachtet, dass die Kernmembran bei Zugabe von Puffer A+ sehr schnell für Proteine durchlässig wurde. Um ein Übertreten von Kernproteinen ins Zytoplasma zu verhindern, wurde für die Präparation des Zellextraktes Puffer A+ mit 0.08 % (v/v) NP-40 verwendet (anstelle von 0.1 %, siehe Kapitel „Methoden und Material“).

4.1.5 Protease- und Nuklease-Tests

Alle nukleären Zellextrakte wurden auf das Vorhandensein sowohl von Proteasen als auch von Nukleasen getestet (siehe Kapitel „Methoden und Material“). Nukleasen würden die in der Reaktion enthaltenden DNS-Sonden und die Kompetitor-DNS verdauen. Andererseits würden die Proteine des nukleären Zellextraktes durch Proteasen verdaut werden. Deshalb war es essentiell, dass alle im Oligo-Pulldown Assay eingesetzten nukleären Zellextrakte frei von diesen Enzymen waren oder diese Enzyme durch die zu den Puffern gegebenen Inhibitoren effizient gehemmt wurden. Dies konnte mit den Protease- und Nuklease-Tests bestätigt werden (Resultate nicht gezeigt).

4.2 Übersicht über das System des Oligo-Pulldown Assays

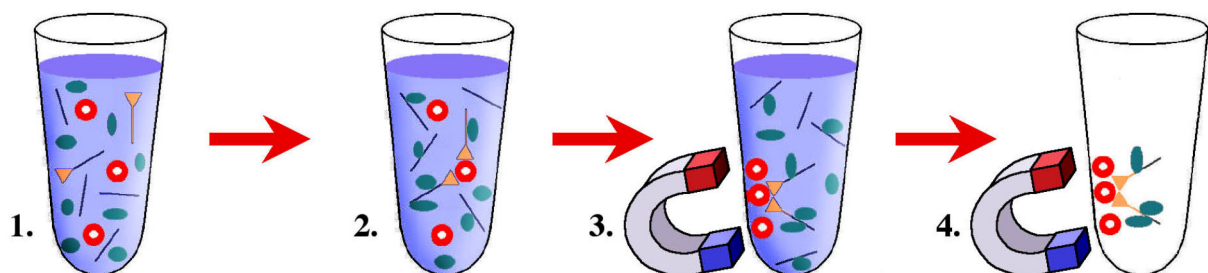
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* Methode entwickelt, mit welcher mittels einer spezifischen DNS-Sonde NF- κ B-abhängige Enhanceosomen aus nukleären Zellextrakten isoliert werden konnten (siehe Kapitel „Projektbeschreibung“). Mit Enhanceosom wird die Gesamtheit der an einen Promotor eines bestimmten Gens gebundenen Proteine bezeichnet. Dazu wurde das System des Oligo-Pulldown Assays weiterentwickelt. Der Assay setzt sich aus vier aufeinanderfolgenden Schritten zusammen:

1. Präparation von nukleären Zellextrakten von stimulierten oder nicht stimulierten Zellen
2. Rekonstitution des Enhanceosoms an der DNS-Sonde
3. Waschschrte zur Entfernung von ungebundenen Proteinen und unbiotinylierter DNS
4. Auftrennung der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE und anschliessende Analyse durch Western-Blot oder Silberfärbung

Die *in vitro* Rekonstitution des Enhanceosoms erfolgte durch Inkubation von nukleärem Zellextrakt mit einer biotinylierten DNS-Sonde, welche spezifische Bindungssequenzen für NF- κ B enthielt, und mit Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads (Kügelchen) in Bindungspuffer. Die DNS-Sonde wurde dabei über die sehr starke Biotin-Streptavidin-Interaktion an die Beads gebunden. Gleichzeitig konnte sich an der DNS-Sonde das Enhanceosom rekonstituieren. Die Koppelung von magnetischen Beads und DNS-Sonde erlaubte es, das an die Sonde rekrutierte Enhanceosom mit Hilfe eines Magneten ohne grossen Aufwand von den übrigen Zellkernproteinen zu trennen. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die biotinylierte DNS-Sonde zu minimieren, wurde ein Überschuss an unspezifischer, unbiotinylierter DNS zur Reaktion gegeben. Im Anschluss an den Bindungsschritt wurde die biotinylierte DNS-Sonde mit den gebundenen Proteinen mehrmals mit Waschpuffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die angereicherten Protein-DNS-Beads-Komplexe in einem geringen Volumen von Ladepuffer für SDS-PAGE resuspendiert und während 5 min bei 100 °C erhitzt. Durch die Erhitzung und das im Puffer enthaltene SDS wurden die Proteine denaturiert und so von der DNS-Sonde gelöst. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magneten von den in Lösung gegangenen Proteinen getrennt. Anschliessend wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Einen Überblick über den Ablauf des Oligo-Pulldown Assays gibt Figur 7.

Figur 7 Das Prinzip des Oligo-Pulldown Assay



Schematische Darstellung des Ablaufs des Oligo-Pulldown Assays. Der nukleäre Zellextrakt wurde mit der biotinylierten DNS, der unspezifischen DNS und den magnetischen Beads inkubiert (1.). Dabei banden die biotinylierten DNS-Stücke einschliesslich der an sie gebundenen Proteine an das Streptavidin auf den magnetischen Beads. Ein Teil der Proteine band an die unbiotinylierte DNS (2.). Anschliessend an die Inkubation wurden die Beads mit einem Magneten an den Rand des Eppendorf-tubes gezogen (3.). Nach dem Entfernen der Flüssigkeit und nachfolgendem dreimaligem Waschen der magnetischen Beads, blieben nur noch die magnetischen Beads mit den an sie gebundenen DNS-Stücken und den daran haftenden Proteinen übrig (4.). Die nicht gebundenen Proteine und die unbiotinylierte DNS mit gebundenen Proteinen wurden während der Waschschriffe entfernt. (— = unbiotinylierte unspezifische DNS; —▶ = biotinylierte spezifische DNS; ● = Proteine (aus dem nukleären Zellextrakt); ● = magnetische Beads)

4.3 Optimierung des Oligo-Pulldown Assays

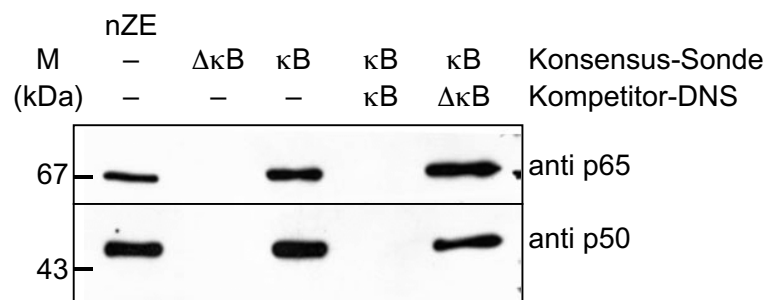
In den ersten Experimenten wurden die Bindungseigenschaften von NF- κ B an spezifische Bindungssequenzen auf der DNS-Sonde analysiert. Dazu wurden anstelle von vollständigen Promotorsequenzen kurze Oligonukleotide verwendet, welche ausschliesslich zwei Bindungssequenzen für NF- κ B enthielten. So konnte eine indirekte Beeinflussung der Bindung von NF- κ B an seine DNS-Sequenz durch andere Promotorsequenzen ausgeschlossen werden. Um komplette Enhanceosomen an die DNS zu rekrutieren, wurden in den darauffolgenden Experimenten Teile der Promotorsequenzen des long terminal repeat (LTR) des menschlichen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ 1 und des Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2) der Maus verwendet.

4.3.1 Ermittlung der Bindungsspezifität von NF- κ B an die κ B-Konsensus-Sonde

In den ersten Experimenten sollte überprüft werden, ob NF- κ B *in vitro* an eine biotinylierte und an magnetische Beads gekoppelte DNS-Sonde mit spezifischen Bindungssequenzen für NF- κ B gebunden werden konnte. Dazu wurde die κ B-Konsensus-Sonde verwendet, welche einer DNS-Sequenz entspricht, wie sie auch für Electromobility Shift Assays (EMSA) benutzt wird (13). Auf der κ B-Konsensus-Sonde befanden sich zwei identische Bindungssequenzen für NF- κ B. Mit Hilfe der $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonde, deren NF- κ B-Bindungssequenzen je sechs Punktmutationen aufwiesen, und der unbiotinylierten κ B- beziehungsweise der $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS (siehe Kapitel „Methoden und Material“) konnte zudem die Spezifität dieser Bindung überprüft werden. Der Oligo-Pulldown Assay wurde wie im Kapitel „Methoden und Material“ beschrieben durchgeführt, wobei nukleärer Zellextrakt von mit UV-Strahlung induzierten HeLa Zellen verwendet wurde. Die isolierten Proteine wurden mit einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschliessend mittels Western-Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen p65 und p50 verwendet.

Die Western-Blot Resultate zeigten, dass p65 und p50 an die κ B-, nicht aber an die $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonde banden (Figur 8). Zudem konnte die Bindung von p65 und p50 an die κ B-Konsensus-Sonde durch die Zugabe eines zehnfachen Überschusses an unbiotinylierter κ B-Kompetitor-DNS verhindert werden. Ein entsprechender Überschuss an unbiotinylierter $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS im Reaktionsgemisch hatte im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die Bindung.

Figur 8 Spezifität der Bindung von p65 und p50 an die κ B-Konsensus-Sonde



Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays mit der κ B-beziehungsweise der $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonde. In der ersten Spalte wurden 10 μ g des nukleären Zellextraktes (nZE) aus UV-induzierten HeLa Zellen analysiert. Es wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

4.3.2 Optimierung des Oligo-Pulldown Assays für die HIV-LTR- und die TLR-2-Sonden

Die Experimente mit der κ B-Konsensus-Sonde zeigten, dass p65 und p50 spezifisch an die NF- κ B-Bindungssequenz rekrutiert wurden. Das nächste Ziel war nun die Rekrutierung von Enhanceosomen an mit Beads gekoppelte DNS-Sonden. Dabei durfte die Bindung der Proteine sterisch nicht durch die Beads behindert werden. Die κ B-Konsensus-Sonde konnte für diesen Zweck nicht verwendet werden, weil sich deren NF- κ B-Bindungssequenzen, bedingt durch die Kürze der Sonde (45 bp), sehr nahe an den Beads befanden. Deshalb mussten längere DNS-Sonden hergestellt werden. Es wurden Ausschnitte aus natürlich vorkommenden Promotorsequenzen des HIV-LTR (714 bp) und des Promotors des TLR-2-Gens der Maus (326 bp) gewählt. Ein weiterer Vorteil dieser beiden Sonden war, dass sie Bindungssequenzen für mehrere Transkriptionsfaktoren enthielten, unter anderem auch für NF- κ B. Diese ermöglichten die Bindung von weiteren im nukleären Zellextrakt vorkommenden Transkriptionsfaktoren an die DNS-Sonde und konnten dadurch zur Bildung von Enhanceosomen beitragen. Versuche zeigten, dass die Bindungsbedingungen, wie sie für die κ B-Konsensus-Sonde gewählt worden waren, nicht für diese viel längeren HIV-LTR- und TLR-2-Sonden übernommen werden konnten (Resultate nicht gezeigt). Aus diesem Grunde mussten folgende Parameter optimiert werden:

- Bindungsbedingungen:
 1. Temperatur und Inkubationszeit
 2. pH-Wert des Bindungspuffers
 3. Salzkonzentration im Bindungspuffer
- Waschbedingungen: pH-Wert und Salzkonzentration im Waschpuffer
- Art der Kompetitor-DNS
- Verhältnis von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde

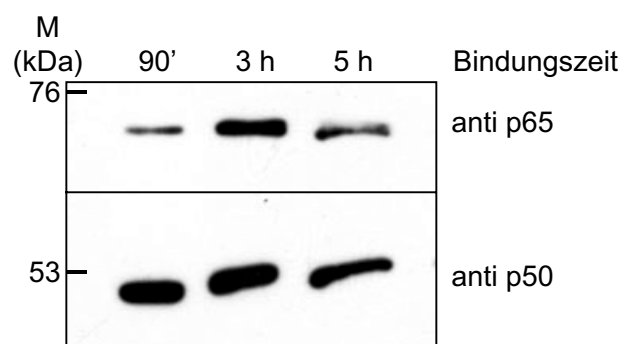
Dabei musste berücksichtigt werden, dass ein möglichst vollständiges Enhanceosom von den restlichen Kernproteinen getrennt werden sollte. Deshalb war es wichtig, dass die Reaktionsbedingungen einerseits so gewählt wurden, dass die Rekonstitution des kompletten Enhanceosoms an der DNS-Sonde möglich war, andererseits jedoch die Bindung der unspezifisch an die DNS bindenden Proteine soweit wie möglich verhindert wurde.

4.3.2.1 Optimierung von Bindungszeit und -temperatur

Die erforderliche Bindungszeit und -temperatur sind beide entscheidend von der Länge der eingesetzten DNS-Sonde abhängig, und wurden deshalb mit der HIV-LTR-Sonde optimiert. Da diese Sonde die längste der zur Verfügung stehenden Sonden war, konnte davon ausgegangen werden, dass die für diese Sonde optimierten Bedingungen auch für die kürzeren TLR-2- und pGL3-Sonden galten.

Bei einer Bindungszeit von 2 h und einer Bindungstemperatur von 4 °C, wie sie für die Versuche mit der κ B-Konsensus-Sonde gewählt wurden, konnte bei der HIV-LTR-Sonde keine Bindung von NF- κ B erreicht werden (Resultate nicht gezeigt). Deshalb wurden für die HIV-LTR-Sonden drei verschiedene Bindungstemperaturen getestet (23 °C, 30 °C und 37 °C). Die Inkubationszeiten variierten zwischen 45 min und 5 h. Das Reaktionsvolumen von 200 μ l enthielt 80 μ g nukleären Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM), 2 μ g κ B-HIV-LTR-Sonde und 1 μ g poly-dA/oligo-dT als Kompetitor-DNS. Die Proteine des nukleären Zellextraktes wurden bei einer Salzkonzentration von 70 mM und einem pH-Wert von 8.0 gebunden. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Der Waschpuffer enthielt 70 mM NaCl. Im Anschluss an den Oligo-Pulldown Assay wurden die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot analysiert (Antikörper gegen p65 und p50). Als optimale Bedingungen erwiesen sich eine Bindungstemperatur von 30 °C während einer Inkubationszeit von 3 h (Figur 9).

Figur 9 Optimierung von Bindungszeit und -temperatur



Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays mit der κ B-HIV-LTR-Sonde und einer Bindungstemperatur von 30 °C. Es wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

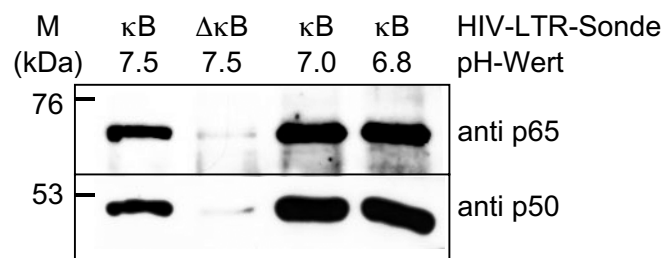
4.3.2.2 Optimierung der pH-Bedingungen im Bindungspuffer

Der pH-Wert beeinflusst die elektrische Ladung und damit auch die Tertiärstruktur und Funktion von Proteinen. So werden durch die veränderte Ladung sowohl die Interaktionen von Proteinen untereinander als auch die DNS-Bindungseigenschaften der Proteine beeinflusst. Aus diesem Grunde war es von grosser Wichtigkeit, den optimalen pH-Wert des Bindungspuffers zu bestimmen.

In einem ersten Schritt wurden pH-Werte von 8.0, 7.8 und 7.5 getestet. Dabei enthielt das Reaktionsvolumen von 200 μ l 80 μ g nukleären Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM), 2 μ g HIV-LTR-Sonde und 1 μ g poly-dA/oligo-dT als Kompetitor-DNS. Die unterschiedlichen pH-Werte wurden alle mit entsprechenden Tris-HCl-Lösungen realisiert. Die NaCl-Konzentration betrug sowohl im Bindungs-, als auch im Waschpuffer 70 mM. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Die isolierten Proteine wurden mit einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschliessend mittels Western-Blot analysiert. Dazu wurden Antikörper gegen p65 und p50 verwendet.

Aus diesem Versuch war ersichtlich, dass bei einem pH-Wert von 7.5 mehr p65 und p50 an die κ B-HIV-LTR-Sonde banden, als bei den höheren pH-Werten (Resultate nicht gezeigt). Deshalb wurde der gleiche Versuch mit pH-Werten von 7.5, 7.0 und 6.8 wiederholt. Bei einem pH-Wert von 7.0 konnten deutlich mehr p65 und p50 an die DNS-Sonde binden als bei einem pH-Wert von 7.5 (Figur 10). Eine Absenkung des pH-Wertes auf 6.8 brachte allerdings keine weitere Verbesserung der Bindung von NF- κ B an die κ B-HIV-LTR-Sonde. Aus diesen Experimenten ging demzufolge hervor, dass im Bindungspuffer ein pH-Wert von 7.0 optimal war.

Figur 10 Optimierung der pH-Bedingungen im Bindungspuffer



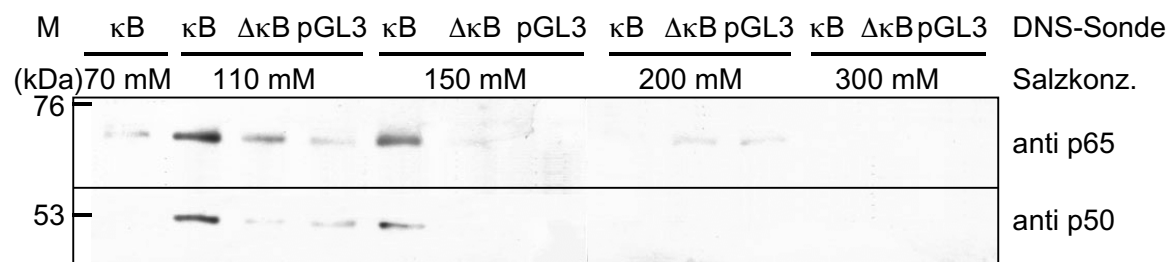
Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays mit der κ B- beziehungsweise $\Delta\kappa$ B-HIV-LTR-Sonde. Es wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

4.3.2.3 Optimierung der Salzkonzentration im Bindungspuffer

Die Salzkonzentration ist ein weiterer Parameter, der die Interaktion zwischen Proteinen und deren Bindungsverhalten zur DNS wesentlich beeinflussen kann. Für den Oligo-Pulldown Assay war es wichtig, dass die Salzkonzentration einerseits nicht zu tief gewählt wurde, damit möglichst wenig unspezifisch an die DNS bindende Proteine im Oligo-Pulldown Assay isoliert wurden. Andererseits durfte sie aber auch nicht zu hoch sein, um die Rekonstitution des Enhanceosoms an der DNS-Sonde nicht zu behindern. Um die für den Oligo-Pulldown Assay optimale Salzkonzentration zu eruieren, wurden folgende NaCl-Konzentrationen im Bindungspuffer getestet: 70 mM, 110 mM, 150 mM, 200 mM und 300 mM. Für jede dieser Salzkonzentrationen wurden 80 µg nukleärer Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM) in einem Reaktionsvolumen von 200 µl mit 800 ng κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2-beziehungsweise pGL3-Sonde (Negativkontrolle, siehe Kapitel „Methoden und Material“) und 1 µg linearisiertem pGL3-Vektor als Kompetitor-DNS inkubiert. Jeder Versuchsansatz wurde mit einem Waschpuffer gewaschen, welcher die gleiche Salzkonzentration aufwies wie der jeweilige Bindungspuffer. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Nach dem Waschschrift wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot analysiert. Dazu wurden Antikörper gegen p65 und p50 verwendet. Die Versuchsansätze mit den κ B-TLR-2- und den pGL3-Sonden wurden doppelt geführt und die isolierten Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt. Danach wurden die Proteinbanden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Je höher die Salzkonzentration im Bindungspuffer war, desto weniger Proteine konnten auf dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden (Resultate nicht gezeigt). Bis zu einer Konzentration von 200 mM war diese Abnahme allerdings nur gering. Erst bei 300 mM NaCl war eine starke Verringerung der an die DNS-Sonde gebundenen Proteinmenge feststellbar. Mit der Western-Blot Analyse konnte p50 bis zu einer NaCl-Konzentration von 150 mM in den Versuchsansätzen mit der κ B-TLR-2-Sonde und bei 110 mM auch mit der $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und der pGL3-Sonde nachgewiesen werden (Figur 11). Das Signal für p65 war bis zu einer Salzkonzentration im Bindungspuffer von 150 mM in den Ansätzen mit der κ B-TLR-2-Sonde sichtbar, wobei zwischen 110 mM und 150 mM eine geringe Abnahme des Signals beobachtet wurde. p65 konnte auch in den Versuchsansätzen mit den $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und den pGL3-Sonden nachgewiesen werden, am stärksten bei 110 mM. Diese unspezifische Bindung wurde allerdings durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 150 mM deutlich reduziert. Als optimale Salzkonzentration im Bindungspuffer wurden aufgrund dieser Ergebnisse 150 mM NaCl ermittelt, da bei dieser Konzentration einerseits die Bindung von NF- κ B an die κ B-TLR-2-Sonde nicht stark beeinträchtigt, andererseits aber dessen Bindung an die $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und die pGL3-Sonde deutlich reduziert wurde.

Figur 11 Optimierung der Salzkonzentration im Bindungspuffer



Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays mit der κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und der pGL3-Sonde. Es wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

4.3.2.4 Optimierung der Salzkonzentration im Waschpuffer

Während dem Oligo-Pulldown Assay wurden die DNS-Sonden nach dem Binden der Proteine mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine von den an die Sonden gebundenen Proteinen zu trennen. Mit den DNS-Sonden wurden jedoch nicht nur die gewünschten Enhanceosomen isoliert, sondern auch Proteine, welche unspezifisch an die DNS binden können. Um die Menge dieser unspezifisch bindenden Proteine zu reduzieren, sollte die höchstmögliche Salzkonzentration im Waschpuffer bestimmt werden, bei welcher NF- κ B noch nicht von der DNS-Sonde dissoziierte. Je höher diese war, desto mehr Interaktionen zwischen Proteinen untereinander und zwischen Proteinen und der DNS wurden gelöst. Bei einer optimalen Salzkonzentration im Waschpuffer sollten möglichst viele der unspezifisch an die DNS-Sonden gebundenen Proteine von dieser dissoziieren. Die Bindung von NF- κ B an seine Bindungssequenzen auf der DNS-Sonde durfte hingegen durch die Salzkonzentration nicht beeinträchtigt werden. Um die optimale Salzkonzentration im Waschpuffer zu eruieren, wurde folgender Versuch durchgeführt: 80 μ g nukleärer Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM) wurden mit 800 ng κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2-beziehungsweise pGL3-Sonde (Negativkontrolle) und 1 μ g linearisiertem pGL3-Vektor als Kompetitor-DNS in einem Reaktionsvolumen von 200 μ l inkubiert. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Nach dem Binden der Proteine an die DNS-Sonden im Bindungspuffer mit 150 mM NaCl wurden die Versuchsansätze bei vier verschiedenen Salzkonzentrationen gewaschen: 150 mM, 190 mM, 230 mM und 270 mM. Die isolierten Proteine wurden mit einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschliessend mittels Western-Blot analysiert. Dabei wurden Antikörper gegen p65 und p50 verwendet. Die Versuchsansätze mit den κ B-TLR-2- und den pGL3-Sonden wurden wiederum doppelt geführt und die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (10 % Gel). Danach wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Auf dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel konnte bei Erhöhung der Salzkonzentration im Waschpuffer keine Reduktion der Proteinbanden beobachtet werden (Resultate nicht gezeigt). Mit der Western-Blot Analyse war eine deutliche Abnahme des an die κ B-TLR-2-Sonde gebundenen p65 und p50 zwischen 190 mM und 230 mM NaCl im Waschpuffer feststellbar (Resultate nicht gezeigt). Bei 190 mM war der Unterschied von gebundenem NF- κ B zwischen der κ B-TLR-2- und den $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und pGL3-Sonden am ausgeprägtesten. Aus diesem Grunde wurde in den späteren Versuchen im Waschpuffer eine NaCl-Konzentration von 190 mM gewählt. Dieses Experiment machte deutlich, dass NF- κ B bei einer tieferen Salzkonzentration im Waschpuffer von der DNS-Sonde dissoziierte als unspezifisch an die DNS bindende Proteine. Folglich konnte auf diese Weise die notwendige Reduktion der unspezifisch an die DNS-Sonde bindenden Proteine nicht erreicht werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt das Augenmerk auf die Kompetitor-DNS in der Bindungsreaktion gerichtet, welche als Ziel-DNS für unspezifisch bindende Proteine, nicht jedoch für NF- κ B dienen sollte.

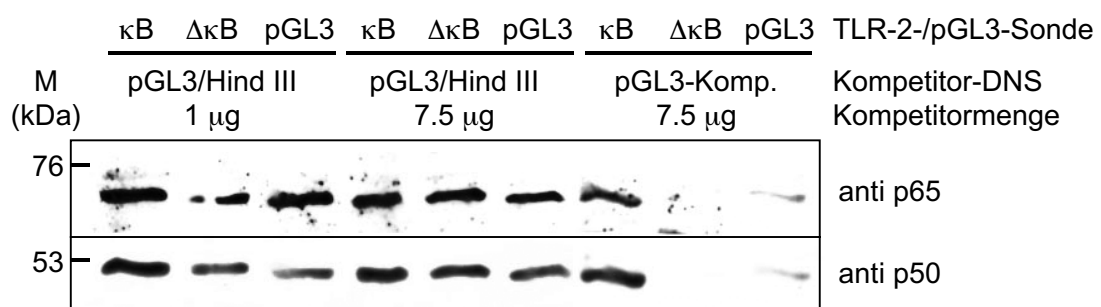
4.3.2.5 Optimierung der Kompetitor-DNS

Unspezifisch an die DNS bindende Proteine können die Bildung von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen an der DNS-Sonde beeinträchtigen, indem sie Bindungssequenzen für NF- κ B oder andere Transkriptionsfaktoren bedecken. Um dies zu verhindern, wurde während des Oligo-Pulldown Assays Kompetitor-DNS zur Reaktionslösung gegeben, welche die unspezifisch an die DNS bindenden Proteine von den DNS-Sonden fernhalten sollte. Dabei musste die Kompetitor-DNS in einem Überschuss gegenüber der DNS-Sonde in der Reaktion vorhanden sein. In früheren Versuchen wurde als Kompetitor-DNS poly-dA/oligo-dT oder linearisierter pGL3-Vektor verwendet. In diesem Experiment wurden zwei verschiedene Konzentrationen von durch Hind III linearisiertem pGL3-Vektor (Länge: 4818 bp) mit pGL3-Kompetitor-DNS (Länge: 402 bp) verglichen. Die pGL3-Kompetitor-DNS wurde mittels PCR aus leerem pGL3-Vektor hergestellt und entsprach der pGL3-Sonde, war aber nicht biotinyliert (siehe Kapitel „Methoden und Material“). 80 μ g nukleärer Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM) wurden mit 800 ng κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2- beziehungsweise pGL3-Sonde (Negativkontrolle) und mit 1 μ g beziehungsweise 7.5 μ g linearisiertem pGL3-Vektor oder 7.5 μ g pGL3-Kompetitor-DNS in einem Reaktionsvolumen von 200 μ l inkubiert. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Im Anschluss an den Oligo-Pulldown Assay wurden die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot (Antikörper gegen p65 und p50) analysiert. Die Versuchsansätze mit den κ B-TLR-2- und den pGL3-Sonden wurden doppelt geführt, die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt und die Proteinbanden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Auf dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel konnten bezüglich der Menge der gebundenen Proteine keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen beobachtet werden (Resultate nicht gezeigt). Mit der Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NF- κ B an die κ B-TLR-2-Sonde durch die Kompetitor-DNS nicht beeinflusst wurde (Figur 12). Hingegen wurde eine deutliche Abnahme der Bindung von p65 und p50 an die $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und die pGL3-Sonde in den Versuchsansätzen mit der pGL3-Kompetitor-DNS im Vergleich zu jenen mit dem linearisierten pGL3-Vektor festgestellt. Mit der pGL3-Kompetitor-DNS konnte somit eine gewisse Reduktion der unspezifisch an die DNS-Sonde bindenden Proteine erreicht werden.

Erstaunlicherweise spielte nicht nur die absolute Menge an linearer DNS, sondern auch deren Länge eine entscheidende Rolle. Der linearisierte pGL3-Vektor ist mit 4818 bp Länge 12 mal länger als die pGL3-Kompetitor-DNS (402 bp). Da von beiden Arten von Kompetitor-DNS die gleiche Menge (7.5 μ g) zugegeben wurde, enthielten die Reaktionen mit pGL3-Kompetitor-DNS 12-mal mehr freie DNS-Moleküle wie jene mit dem linearisierten pGL3-Vektor. 7.5 μ g pGL3-Kompetitor-DNS entsprechen einem 11-fachen Überschuss an Kompetitor-DNS-Molekülen gegenüber den DNS-Sonden. Da der Effekt auf dem durch Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel jedoch gering war, musste die Menge an Kompetitor-DNS in den späteren Experimenten noch zusätzlich erhöht werden.

Figur 12 Optimierung der Kompetitor-DNS



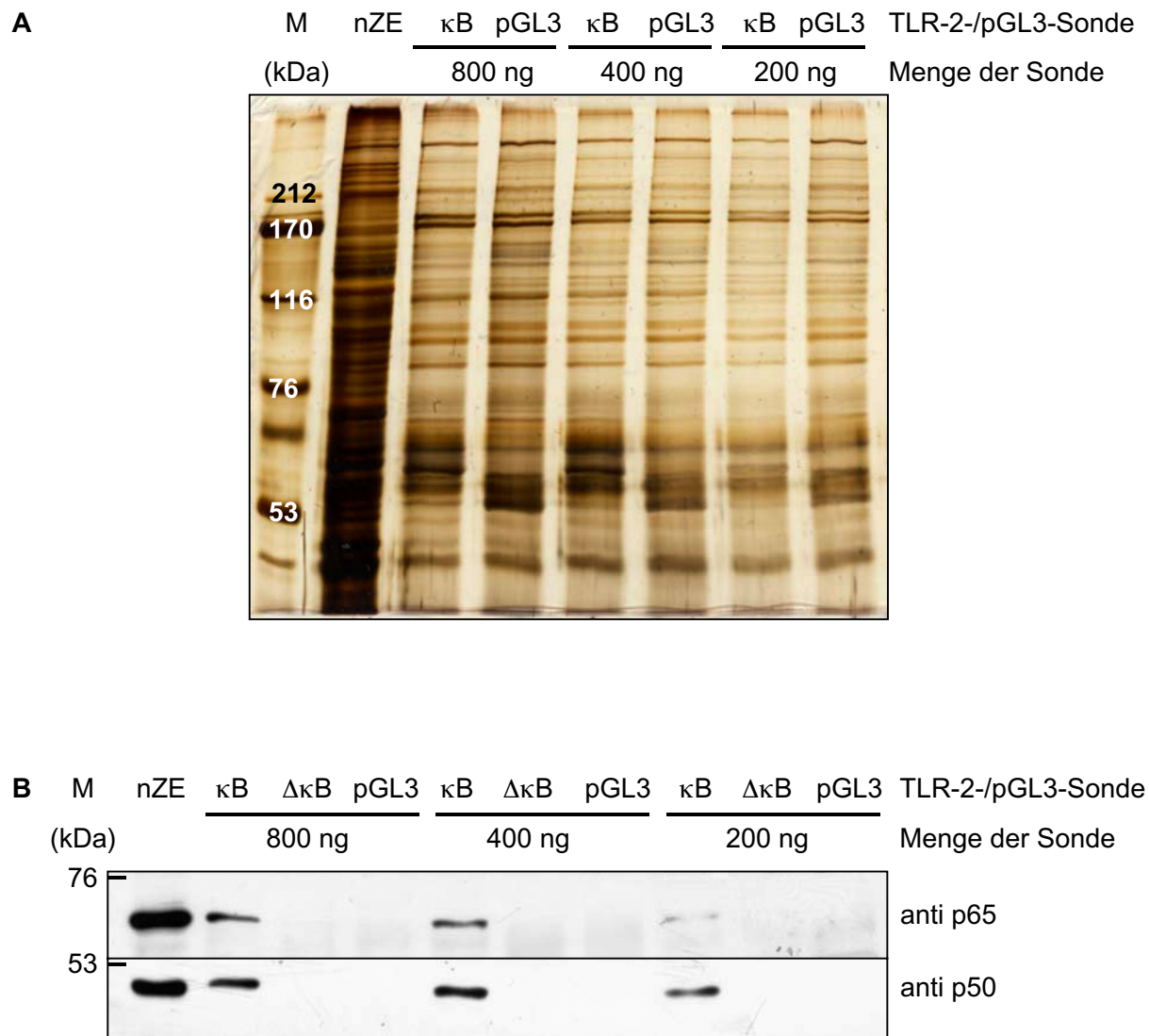
Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays mit der κ B-TLR-2-Sonde, der $\Delta\kappa$ B-TLR-2-Sonde und der pGL3-Sonde. Es wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

4.3.2.6 Optimierung des Verhältnisses von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde

Mit dem Einsatz des pGL3-Kompetitors banden p65 und p50 spezifisch an die κ B-TLR-2-Sonde. Wurden die Versuchsansätze allerdings auf einem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert, konnte zwischen den Versuchsansätzen mit den verschiedenen DNS-Sonden (κ B-TLR-2- und pGL3-Sonde) dennoch kein unterschiedliches Bandenmuster beobachtet werden (siehe Kapitel „Optimierung der Kompetitor-DNS“). Daraus wurde geschlossen, dass mit der DNS-Sonde noch immer zu viele unspezifisch an die DNS bindende Proteine isoliert wurden, welche die gesuchten Proteinbanden überdeckten. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Menge des pGL3-Kompetitors verdoppelt. Eine Reduktion der unspezifisch an die DNS-Sonde bindenden Proteine kann auch dadurch erzielt werden, dass die Menge der an die Beads gekoppelten Sonde selbst im Versuchsansatz so weit wie möglich vermindert wurde. Dabei musste jedoch gewährleistet werden, dass die Isolierung der NF- κ B-Komplexe nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Im folgenden Experiment wurde die Menge an DNS-Sonde von der ursprünglichen Menge (800 ng DNS-Sonde und 60 μ g Beads) auf die Hälfte (400 ng DNS-Sonde und 30 μ g Beads) beziehungsweise auf einen Viertel (200 ng DNS-Sonde und 15 μ g Beads) reduziert. Es wurden 80 μ g nukleärer Zellextrakt von PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM) mit der entsprechenden Menge an κ B-TLR-2-, Δ κ B-TLR-2- beziehungsweise pGL3-Sonde (Negativkontrolle) und 15 μ g pGL3-Kompetitor-DNS in einem Reaktionsvolumen von 500 μ l inkubiert. Das Reaktionsvolumen wurde gegenüber früheren Versuchen erhöht, um eine Aggregation der magnetischen Beads während der Inkubation zu verhindern. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Die isolierten Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot (Antikörper gegen p65 und p50) analysiert. Die Versuchsansätze mit den κ B-TLR-2- und den pGL3-Sonden wurden doppelt geführt und die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt. Danach wurden die Proteinbanden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Auf dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nahm die Intensität der Proteinbanden proportional mit der eingesetzten Menge an DNS-Sonde ab (Figur 13 A). Bei der Western-Blot Analyse konnte eine gute Spezifität der Signale von p65 und p50 für die κ B-TLR-2-Sonde beobachtet werden (Figur 13 B). Die Signale blieben bei 400 ng κ B-TLR-2-Sonde gegenüber der Ausgangsmenge unverändert. Bei einer weiteren Reduktion auf 200 ng DNS-Sonde nahmen die Signale sowohl für p65 als auch für p50 deutlich ab. Aus diesem Experiment ist ersichtlich, dass eine Menge von 400 ng DNS-Sonde optimal ist. Dies entspricht einem 44-fachen Überschuss von Kompetitor-DNS-Molekülen gegenüber den DNS-Sonden.

Figur 13 Optimierung des Verhältnisses von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde



Silbergelanalyse (A) und Western-Blot Analyse (B) eines Oligo-Pulldown Assays, bei dem unterschiedliche Mengen an DNS-Sonden (200-800 ng) eingesetzt wurden. In den ersten Spuren nach dem Proteinmarker wurden 8 μ g (Silbergel) beziehungsweise 16 μ g (Western-Blot) nukleärer Zell-extrakt analysiert, was 10 % beziehungsweise 20 % der im Oligo-Pulldown Assay eingesetzten Menge entsprach. Für die Western-Blot Analyse wurden Antikörper gegen p65 (obere Membran) und p50 (untere Membran) verwendet.

4.4 Analyse von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie

4.4.1 Auftrennung der im Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteine mittels SDS-PAGE

Um Proteinbanden mit der Methode der Massenspektrometrie analysieren zu können, wurden die Proteinfractionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mit Silber gefärbt. Für die Analyse wurden Proteine gewählt, welche spezifisch an die κ B-Sonde banden (TLR-2 oder HIV-LTR). Es interessierten also Proteinbanden, die bei den Versuchsansätzen mit den κ B- und Δ Sp1-TLR-2-Sonden beziehungsweise mit der κ B-HIV-LTR-Sonde erschienen, nicht jedoch bei jenen mit den Δ κ B-TLR-2- und pGL3-Sonden beziehungsweise mit der Δ κ B-HIV-LTR-Sonde. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell so eng wie möglich aus dem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Damit die Proteinbanden problemlos einzeln ausgeschnitten werden konnten, mussten sie im SDS-Polyacrylamidgel möglichst weit aufgetrennt werden. Deshalb wurde für diese Versuche ein Gel von 17 cm Länge benutzt (anstatt 6 cm wie in früheren Experimenten). Da für die Massenspektrometrieanalyse ein hohes Protein/Gel-Verhältnis erforderlich ist, mussten die Proteinbanden so schmal wie möglich und scharf abgegrenzt sein. Deshalb wurden alle Versuchsansätze doppelt geführt und die isolierten Proteine auf zwei SDS-Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichen Gehalten an Polyacrylamid (7.5 % und 12 %) analysiert. Dadurch konnten unterschiedliche Grössenbereiche optimal aufgetrennt werden: Mit dem 7.5 % Gel werden Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 50 und 150 kDa und mit dem 12 % Gel solche im Bereich zwischen 15 und 80 kDa optimal aufgetrennt.

Um die Ausnützung des im nukleären Zellextrakt vorhandenen NF- κ B während dem Oligo-Pulldown Assay zu verbessern, wurde in diesem Experiment die DNS-Sonde (inklusive Beads) bei konstanter Menge an nukleärem Zellextrakt verdoppelt. Weil das im vorhergehenden Experiment ermittelte optimale Verhältnis von DNS-Sonde zu Kompetitor-DNS (1:44) eingehalten werden sollte, wurde auch deren Menge verdoppelt. 80 μ g nukleärer Zellextrakt von mit PMA induzierten Jurkat Zellen (1 h, 32 nM) wurden mit 800 ng κ B-TLR-2-, Δ κ B-TLR-2- Δ Sp1-TLR-2- beziehungsweise pGL3-Sonde und 30 μ g pGL3-Kompetitor in einem Reaktionsvolumen von 1 ml inkubiert. Die übrigen Komponenten entsprachen den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Zusätzlich wurde ein Versuchsansatz mit uninduziertem nukleärem Zellextrakt von Jurkat Zellen und der κ B-TLR-2-Sonde hergestellt. Alle Versuchsansätze wurden doppelt geführt. Die isolierten Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt (7.5 % und 12 % Gel) und die Gele anschliessend mit Silber gefärbt.

Auf dem 7.5 % Gel wurde eine gute Auftrennung auch im hochmolekularen Bereich beobachtet, das heisst bei einem Molekulargewicht von über 100 kDa (Figur 14). Als Nachteil bei diesem Gel erwies sich allerdings, dass die Banden v.a. von kleineren Proteinen (Molekulargewicht unter 100 kDa) verbreitert dargestellt wurden, wodurch das Protein/Gel-Verhältnis negativ beeinflusst wurde. Ein 7.5 % SDS-Polyacrylamidgel eignete sich somit nicht zur Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden mit einem Molekulargewicht unter 100 kDa. Im Gegensatz dazu wurden auf dem 12 % Gel Proteine mit einem Molekulargewicht von über 70 kDa sehr eng beieinander abgebildet. Dieses Gel würde sich dafür hervorragend eignen um kleinere Proteine (Molekulargewicht unter 50 kDa) darzustellen. In diesem Experiment konnten jedoch keine Proteine dieser Grösse nachgewiesen werden.

Sowohl auf dem 7.5 % als auch auf dem 12 % Gel konnten bezüglich des Bandenmusters mehrere Unterschiede zwischen den einzelnen Spuren festgestellt werden. Diese sind in Figur 14 mit nummerierten weissen Dreiecken markiert. Eine Doppelbande von sehr hohem Molekulargewicht konnte nur in den Versuchsansätzen mit den TLR-2-Sonden nachgewiesen werden (κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und Δ Sp1-TLR-2-Sonde), nicht aber in jenem mit der pGL3-Sonde (Dreiecke #1 und #2 auf dem 7.5 % Gel). Diese Proteine banden möglicherweise spezifisch an den TLR-2-Promotor, ihre Bindungsaffinität wurde allerdings nicht durch die An- beziehungsweise Abwesenheit der NF- κ B- oder Sp1-Bindungssequenzen beeinflusst. Im Grössenbereich von 200 kDa wies das Bandenmuster der verschiedenen Versuchsansätze gleich mehrere Unterschiede auf. Im Bereich des Dreiecks #3 war bei den Spuren mit den κ B-TLR-2-Sonden eine Doppelbande nachweisbar, bei den übrigen Versuchsansätzen jedoch Einzelbanden, wobei diese nicht eindeutig der oberen oder unteren Bande der Doppelbande zugeordnet werden konnten. Es könnte sich bei den Einzelbanden jedoch auch um andere Proteine handeln, welche bei den κ B-TLR-2-Sonden nicht erschienen. Das Dreieck #4 auf dem 7.5 % Gel deutet auf eine Proteinbande, welche nur in den Spuren mit den κ B- und Δ Sp1-TLR-2-Sonden auftraten. In den Spuren mit der $\Delta\kappa$ B-TLR-2- und der pGL3-Sonde fehlte diese Proteinbande jedoch. Dieses Bandenmuster deutete auf eine Spezifität des Proteines für die NF- κ B-Sequenz auf dem TLR-2-Promotor hin. Das Protein band allerdings bereits im uninduzierten Zellextrakt an die Promotorsequenz. Ein weiteres Protein konnte nur im Versuchsansatz mit der $\Delta\kappa$ B-TLR-2-Sonde dargestellt werden (Dreieck #5 auf dem 7.5 % Gel). Dieses Protein konnte möglicherweise nur in der Abwesenheit von NF- κ B an den TLR-2-Promotor binden. Ein ähnliches Bild präsentierte sich auf dem 12 % Gel, wobei hier die oben erwähnten Proteinbanden zwar sehr scharf, aber zu nahe beieinander abgebildet wurden, was eine Beurteilung verunmöglichte (Dreieck #7 auf dem 12 % Gel). Bei den Banden, welche auf beiden Gelen mit den Dreiecken #6 markiert sind, handelte es sich vermutlich um die im Versuch eingesetzten DNS-Sonden und nicht um Unterschiede im Proteinbandenmuster. Entsprechende Banden konnten in allen bisherigen Sil-

Figur 14 Auftrennung der im Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteine mittels SDS-PAGE



Zusammenfassend zeigte das 12 % Gel keine Vorteile gegenüber dem 7.5 % Gel und den 10 % Gelen, wie sie in früheren Versuchen verwendet wurden. Als Nachteil des 7.5 % Gels verglichen mit 10 % Gelen erwies sich vor allem die schlechtere Darstellung der Proteinbanden. Für die weiteren Experimente wurde aus diesem Grunde eine Polyacrylamidkonzentration von 10 % verwendet. Bei dieser Konzentration wurden Proteine im Grössenbereich, in welchem sich die Unterschiede im Proteinbandenmuster darstellten, einerseits als scharfe und schmale Banden abgebildet. Andererseits wurden die Banden aber trotzdem ausreichend aufgetrennt, um das problemlose Ausschneiden zu ermöglichen.

4.4.2 Oligo-Pulldown Assay von THP-1, Jurkat und Hodgkin Zellextrakten mit den TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden (Silbergel und Western-Blot Analyse)

Da von den SDS-Polyacrylamidgelen der hier beschriebenen Experimente später Proben für die Massenspektrometrieanalyse ausgeschnitten werden sollten, wurde bei der Zubereitung der Proben grösste Sorgfalt gewahrt, um Kontaminationen der Versuchsansätze oder des Gels mit Proteinen aus der Umgebung zu vermeiden. Es wurden nukleäre Zellextrakte von drei Zelllinien verwendet: THP-1, Jurkat und Hodgkin Zellen. Von den THP-1 und Jurkat Zelllinien wurden sowohl uninduzierte als auch induzierte, von der Hodgkin Zelllinie nur uninduzierte nukleäre Zellextrakte hergestellt. Es wurden die optimierten Zellinduktionsbedingungen gewählt (siehe Kapitel „Induktion von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien“). Zusätzlich zu der pGL3- (Negativkontrolle) und den drei TLR-2-Sonden wurden in diesem Versuch auch die beiden HIV-LTR-Sonden eingesetzt. Um die Proteinbanden auf dem mit Silber gefärbten Gel deutlicher zu sehen und das Protein/Gel-Verhältnis zu erhöhen, wurde die eingesetzte Menge an nukleärem Zellextrakt von 80 μ g auf 120 μ g erhöht. Dabei wurden die anderen Komponenten des Oligo-Pulldown Assays und das Reaktionsvolumen ebenfalls um den Faktor 1.5 erhöht, damit die optimierten Verhältnisse zwischen den Komponenten beibehalten wurden. Der Oligo-Pulldown Assay wurde mit den optimierten Versuchsbedingungen durchgeführt (siehe Kapitel „Methoden und Material“). Für jede Zelllinie wurde je ein Versuchsansatz mit induziertem Zellextrakt (bei der Hodgkin Zelllinie uninduziert) und der κ B-TLR-2-, $\Delta\kappa$ B-TLR-2, Δ Sp1-TLR-2-, pGL3-, κ B-HIV-LTR- und der $\Delta\kappa$ B-HIV-LTR-Sonde durchgeführt. Für die THP-1 und Jurkat Zelllinien wurde zusätzlich je ein Ansatz mit uninduziertem Zellextrakt und der κ B-TLR-2- beziehungsweise der κ B-HIV-LTR-Sonde analysiert. Die isolierten Proteine wurden mit 10 % SDS-Polyacrylamidgelen von 17 cm Länge und 1.5 mm Dicke aufgetrennt und die Gele anschliessend mit Silber gefärbt. Als Kontrolle wurde ausserdem für jede Zelllinie eine Western-Blot Analyse durchgeführt, um die Spezifität der NF- κ B-Bindung an die verschiedenen Sonden zu belegen. Für diese Versuchsansätze wurden alle oben erwähnten DNS-Sonden mit induziertem (THP-1 und Jurkat Zelllinien) beziehungsweise uninduziertem (Hodgkin Zelllinien) nukleärem Zellextrakt inkubiert. Die Konzen-

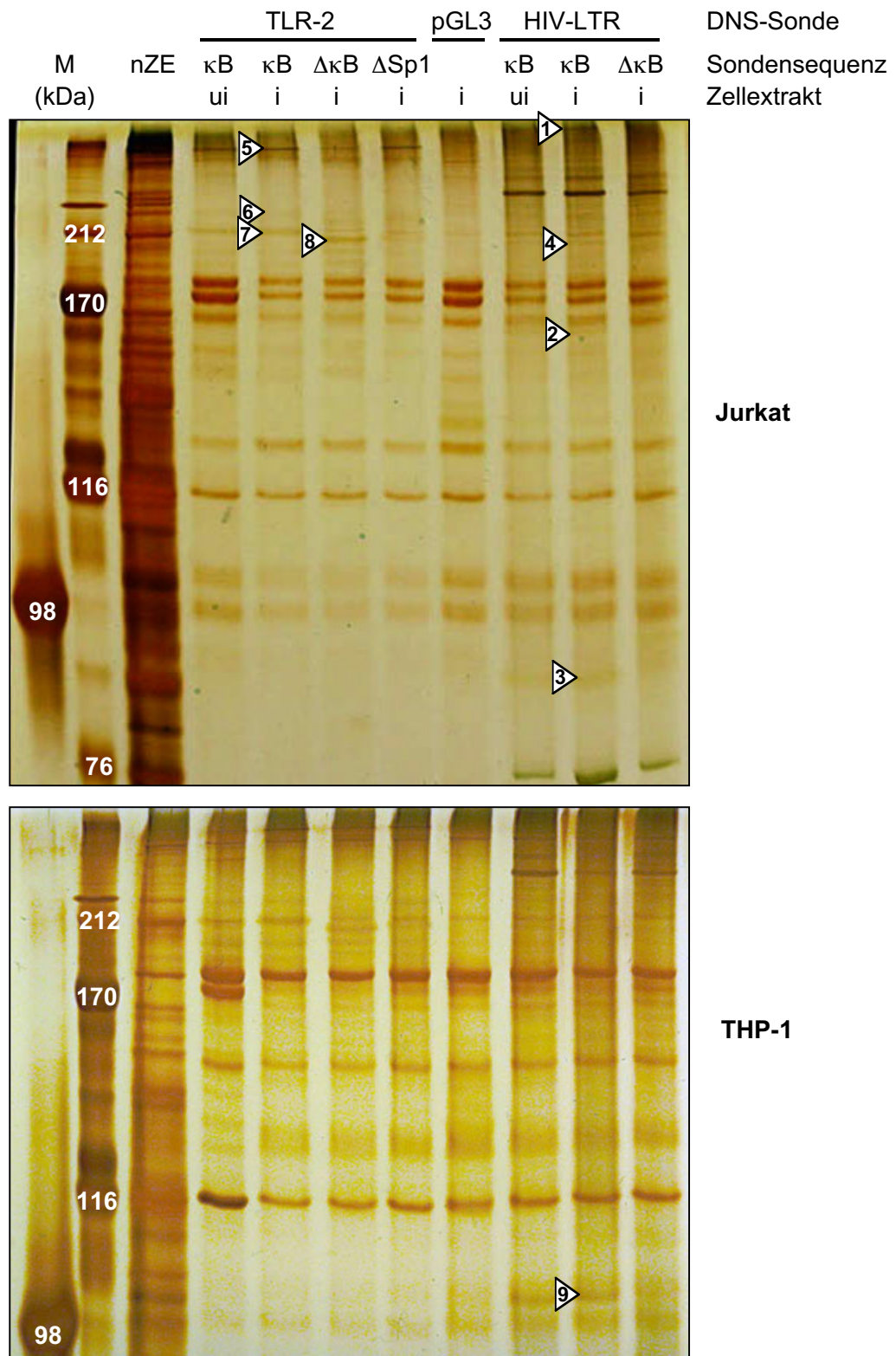
trationen der Komponenten sowie das Reaktionsvolumen entsprach den Bedingungen, wie sie im Kapitel „Methoden und Material“ aufgeführt sind. Für die Western-Blot Analyse wurde ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel und anschliessend ein Antikörper gegen p50 verwendet.

Auf den drei mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen konnten verschiedene Arten von Proteinbanden beobachtet werden, welche zur besseren Übersicht anhand der folgenden fünf Kriterien klassifiziert wurden:

1. Proteinbanden, die nur aus einer bestimmten Zelllinie isoliert wurden (Zelllinien-spezifische Banden).
2. Proteinbanden, die abhängig vom Stimulationszustand der Zelllinie isoliert wurden (Stimulations-abhängige Banden).
3. Proteinbanden, die nur mit einer bestimmten Art von DNS-Sonde (z.B. HIV-LTR) isoliert wurden (Sonden-spezifische Banden).
4. Proteinbanden, die nur mit einer bestimmten Form einer DNS-Sonde (z.B. κ B-HIV-LTR-Sonde) isoliert wurden (Sequenz-spezifische Banden).
5. Proteinbanden, die aus allen Zelllinien mit allen DNS-Sonden isoliert wurden (unspezifische Banden).

Mit der Silberfärbung der Gele wurden mehrheitlich unspezifische Proteinbanden nachgewiesen. Auf dem Silbergel mit den Versuchsansätzen der Hodgkin Zellextrakte wurden zusätzlich Zelllinien-spezifische und Sonden-spezifische, aber keine Sequenz-spezifischen Proteinbanden beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten auf den mit Silber gefärbten Gelen, mit welchen die THP-1 und Jurkat Zelllinien analysiert wurden, neben unspezifischen, Zelllinien- und Sonden-spezifischen zusätzlich Sequenz-spezifische und Stimulations-abhängige Proteinbanden nachgewiesen werden (Figur 15). Insgesamt wurden neun Proteinbanden (in Figur 15 mit nummerierten Dreiecken markiert) aus diesen beiden Gelen für die Analyse mittels Massenspektrometrie ausgeschnitten (siehe Kapitel „Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden“).

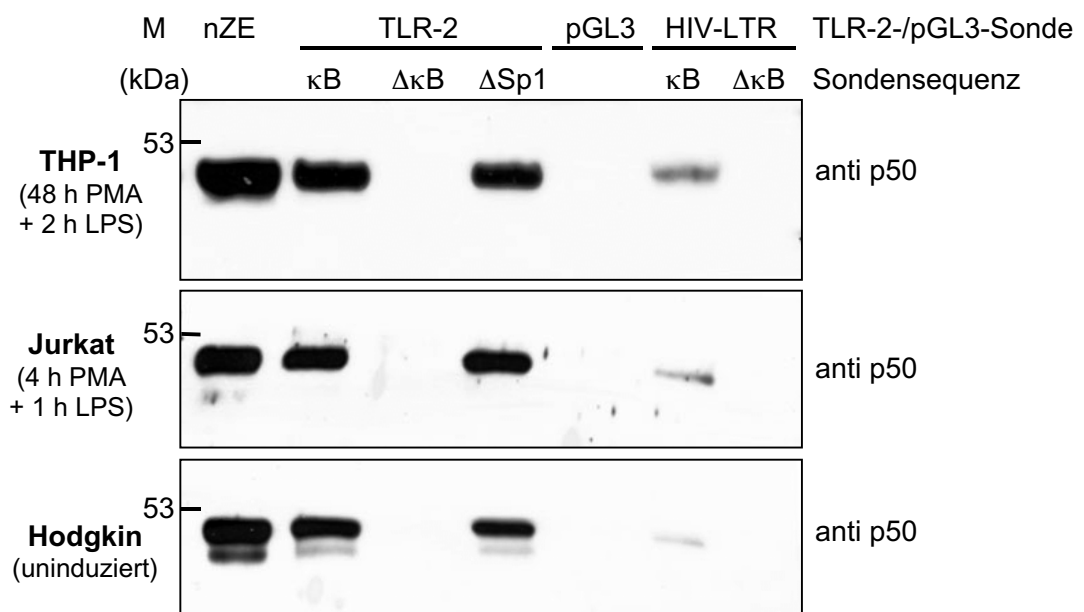
Figur 15 Oligo-Pulldown Assay von THP-1 und Jurkat Zellextrakten mit den TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden (Silbergelanalyse)



Silbergelanalysen von Oligo-Pulldown Assays mit Jurkat (oberes Gel) und THP-1 Zellextrakten (unteres Gel). Mit weissen Dreiecken sind jene Proteinbanden markiert, welche ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert wurden (siehe Kapitel „Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden“). ui = uninduzierter, i = induzierter nukleärer Zellextrakt (Jurkat: 4 h 100 nM PMA + 1 h 5 µg/ml LPS; THP-1: 48 h 200 nM PMA + 2 h 5 µg/ml LPS).

Mit der Western-Blot Analyse konnte nachgewiesen werden, dass p50 spezifisch an die NF- κ B-Bindungssequenz der DNS-Sonden band (Figur 16). Mit der κ B-HIV-LTR-Sonde konnte im Vergleich zur κ B-TLR-2-Sonde weniger p50 isoliert werden, obwohl von beiden Sonden die gleiche molare Menge zu den Versuchsansätzen beigegeben wurde. Ein möglicher Grund dafür könnte in der Länge der Sonde liegen. Die HIV-LTR-Sonde ist knapp doppelt so lang wie die TLR-2-Sonde.

Figur 16 Oligo-Pulldown Assay von THP-1, Jurkat und Hodgkin Zellextrakten mit den TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden (Western-Blot Analyse)



Western-Blot Analyse von induzierten (THP-1 und Jurkat Zelllinien) beziehungsweise uninduzierten (Hodgkin Zelllinien) nukleären Zellextrakten mit TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden. Es wurde ein Antikörper gegen p50 verwendet. In der ersten Spur wurden 16 μ g des entsprechenden nukleären Zellextraktes (nZE) analysiert, was 20 % der im Oligo-Pulldown Assay eingesetzten Menge entspricht.

4.4.3 Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden

Für die Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden wurden die mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgele mit nukleären Zellextrakten der THP-1 und Jurkat Zelllinien verwendet, welche im Kapitel „Oligo-Pulldown Assay von THP-1, Jurkat und Hodgkin Zellextrakten mit den TLR-2-, pGL3- und HIV-LTR-Sonden (Silbergel und Western-Blot Analyse)“ beschrieben wurden (Figur 15). Es wurden primär NF- κ B-abhängige Proteinbanden ausgewählt. Das heisst es wurden Banden analysiert, welche bei den Versuchsansätzen mit den Sonden mit nicht mutierter NF- κ B-Bindungssequenz erschienen, nicht jedoch bei jenen mit

mutierter NF- κ B-Bindungssequenz beziehungsweise bei der pGL3-Sonde, welche keine NF- κ B-Bindungssequenz besass (Sequenz-spezifische Proteinbanden). Zusätzlich interessierten auch Proteinbanden, welche nur mit einer bestimmten Sonde nachgewiesen werden konnten, wie zum Beispiel die Bande #5, die nur mit der TLR-2-Sonde isoliert werden konnte (Sonden-spezifische Proteinbande) (Figur 15). Die Bande #8 wurde nur mit einer ganz bestimmten Sonden-Sequenz isoliert ($\Delta\kappa$ B-TLR-2-Sonde) und wurde deshalb ebenfalls analysiert. Da bei den Silbergelelektrophoresen mit den THP-1 und Jurkat Zellextrakten teilweise analoge Proteinbandenmuster beobachtet wurden, wurden einander entsprechende Banden nur von einer Zelllinie analysiert. Insgesamt wurden neun Proteinbanden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert (in Figur 15 mit nummerierten Dreiecken markiert). Die Massenspektrometrieanalysen wurden einerseits am Institute de Biochimie der Universität Lausanne, andererseits am Functional Genomics Center Zürich durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3 Resultate der Massenspektrometrieanalysen von mit dem Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteinen

Nr. der Bande	Zelllinie	DNS-Sonde	Proteingrösse auf Gel (kDa)	analysiert von	gefundene Proteine		
					Name	ID-Nr.	Grösse (kDa)
#1	Jurkat	κ B-HIV-LTR	>300	IBL	Keratin		44-70
#2	Jurkat	κ B-HIV-LTR	ca. 160	IBL	kein Protein gefunden		
#3	Jurkat	κ B-HIV-LTR	ca. 80	IBL	KIAA1455 Protein	BAA95979	195
#4	Jurkat	κ B-HIV-LTR	ca. 190	IBL	Keratin		44-70
#5	Jurkat	κ B-TLR-2	>300	FGCZ	Keratin		44-70
#6	Jurkat	κ B-TLR-2	ca. 250	FGCZ	Keratin		44-70
#7	Jurkat	κ B-TLR-2	ca. 212	FGCZ	Keratin		44-70
#8	Jurkat	$\Delta\kappa$ B-TLR-2	ca. 200	FGCZ	Keratin		44-70
#9	THP-1	κ B-HIV-LTR	ca. 100	FGCZ	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	AAH51192	78
					Keratin		44-70

(IBL = Institute de Biochimie Lausanne; FGCZ = Functional Genomics Center Zürich)

Bei der Analyse von Bande #3 konnte das menschliche Protein „KIAA1455“ identifiziert werden. In der Bande #9 wurde das menschliche Protein „Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)“ nachgewiesen. Beide Proteine wurden im Rahmen von Genomanalysen in den Jahren 2000 beziehungsweise 2002 über die entsprechenden Gene entdeckt (118, 119). Das berechnete Molekulargewicht der identifizierten Proteine entspricht zwar nicht dem Molekulargewicht der entsprechenden Banden, doch kann die Unstimmigkeit mit Proteolyse beziehungsweise posttranslationaler Modifikation erklärt werden, worauf im Kapitel „Diskussion“ näher eingegangen wird. Des Weiteren wurde in der Bande #9 menschliches Keratin nachgewiesen. Da die verschiedenen Formen von menschlichem Keratin ein Molekulargewicht zwischen 44 und 70 kDa haben, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Verunreinigungen des Silbergels oder der Proteinbanden nach dem Ausschneiden handelte. In sechs der neun analysierten Proteinbanden wurde als alleiniges Protein menschliches Keratin identifiziert (#1 und #4-8). Die Analyse von Bande #2 führte nicht zur Identifikation eines Proteins. Bei dieser Proteinbande wurde vermutlich die Nachweisgrenze der Massenspektrometrieanalyse unterschritten.

4.5 Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Promotorsequenz

Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob sich das Versuchssystem des Oligo-Pulldown Assays auch dazu eignete, Protein-Protein-Interaktionen an der NF- κ B-Bindungssequenz mittels Western-Blot Analysen zu untersuchen. Da noch nicht restlos geklärt ist, wie die Transkriptionsaktivität von an die DNS gebundenem NF- κ B beendet wird, sollte dies anhand der konkreten Fragestellung geschehen, ob NF- κ B durch I κ B α von seiner Promotorsequenz entfernt werden kann und ob I κ B α die Bindung von NF- κ B an die DNS verhindern kann.

Für dieses Experiment wurde rekombinanter I κ B α verwendet, der mit Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert war. Um eine Beeinflussung des Assays durch GST auszuschliessen, wurden alle Versuchsansätze zusätzlich mit einem zweiten GST-gekoppelten Protein durchgeführt (GST-PARP-1). Für den Oligo-Pulldown Assay wurden die κ B-Konsensus- und die κ B-HIV-LTR-Sonden und nukleärer Zellextrakt von mit Etoposid induzierten HeLa Zellen eingesetzt (20 μ M, 2 h). Die GST-gekoppelten Proteine wurden in einem 100-fachen molaren Überschuss im Vergleich zu den DNS-Sonden zum Reaktionsgemisch gegeben. Der Versuch wurde wie im Kapitel „Methoden und Material“ beschrieben durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt und mit Western-Blot analysiert.

Mit dem Oligo-Pulldown Assay wurden folgende drei Versuchsreihen entworfen:

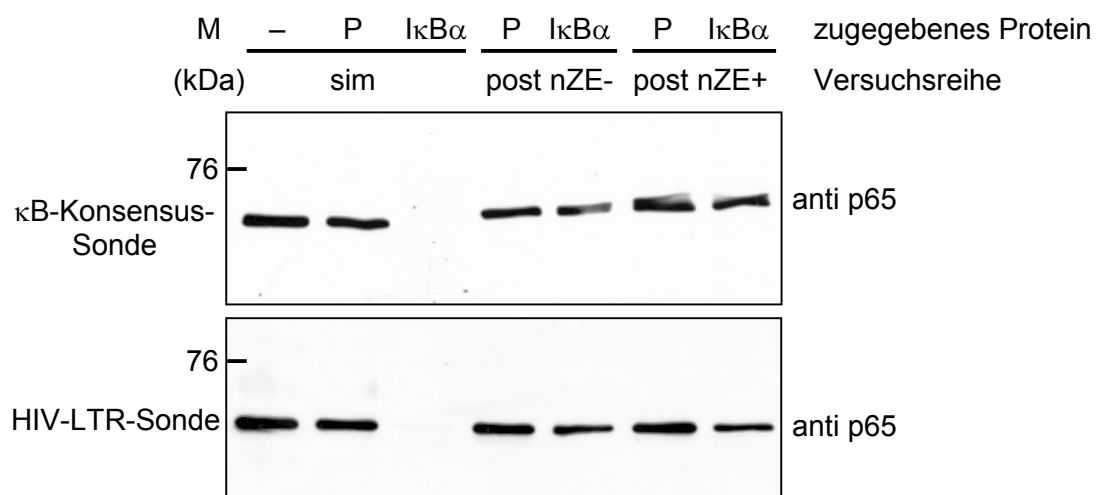
- sim: GST-PARP-1 beziehungsweise GST-I κ B α wurden zusammen mit den übrigen Komponenten der Bindungsreaktion zugegeben. Durch die gleichzeitige Inkubation von I κ B α und dem nukleären Zellextrakt konnte untersucht werden, ob die Anwesenheit von I κ B α die Bindung von NF- κ B an seine Bindungssequenz auf der DNS-Sonde verhinderte.
- post nZE-: GST-PARP-1 beziehungsweise GST-I κ B α wurden nach dem Binden der nukleären Proteine an die DNS-Sonden zu den gewaschenen Beads gegeben, d.h. ungebundene Proteine des nukleären Zellextraktes wurden bereits entfernt. Mit diesen Versuchsansätzen konnte erforscht werden, ob I κ B α allein in der Lage war, gebundenes NF- κ B von seiner Bindungssequenz zu entfernen.
- post nZE+: GST-PARP-1 beziehungsweise GST-I κ B α wurden nach der 15-stündigen Inkubation der Bindungsreaktion zugefügt, d.h. die Proteine des nukleären Zellextraktes waren noch im Reaktionsgemisch vorhanden. Falls NF- κ B durch I κ B α alleine nicht von den DNS-Sonden entfernt würde, konnte mit diesen Versuchsansätzen überprüft werden, ob von I κ B α andere Komponenten aus dem nukleären Zellextrakt benötigt wurden, um die Bindung von NF- κ B an seine Bindungssequenz zu beenden.

Für die Versuchsreihe „sim“ wurde der Oligo-Pulldown Assay auch ohne Zugabe von rekombinanten Proteinen durchgeführt. Durch Vergleich dieses Versuchsansatzes mit jenen, bei welchen GST-I κ B α beziehungsweise GST-PARP-1 zugegeben wurde, konnte bestimmt werden, wie gross der Einfluss der zugegebenen Proteine auf die Menge an isoliertem NF- κ B war.

Mit dieser Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, dass NF- κ B in Anwesenheit von GST-I κ B α im Reaktionsgemisch nicht mehr an seine Bindungssequenzen auf den DNS-Sonden band (Figur 17). Durch die Zugabe von GST-I κ B α nach dem Binden der Proteine an die DNS-Sonden und dem Waschen der Beads konnte gebundenes NF- κ B nicht von seiner Bindungssequenz entfernt werden. Auch wenn zu an die DNS-Sonde gebundenem NF- κ B GST-I κ B α zugegeben wurde, ohne die Proteine des nukleären Zellextraktes zu entfernen, war I κ B α nicht in der Lage, mit Hilfe der vorhandenen nukleären Proteine die Bindung von NF- κ B an die DNS zu beenden. Der Einsatz von GST-PARP-1 beeinträchtigte die Bindung von NF- κ B an die DNS-Sonde in keiner Versuchsreihe. Daraus konnte geschlossen werden, dass die mit I κ B α beobachteten Effekte nicht durch GST hervorgerufen wurden. Die Art der im Oligo-Pulldown Assay eingesetzten DNS-Sonde hatte keinen Einfluss auf das Resultat.

Aus den Ergebnissen dieses Versuches konnte geschlossen werden, dass I κ B α unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage ist, die Dissoziation von NF- κ B von der DNS zu bewirken. Zudem konnte demonstriert werden, dass sich das System des Oligo-Pulldown Assays auch für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen an der NF- κ B-Bindungssequenz mittels Western-Blot Analysen eignete.

Figur 17 Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Promotorsequenz



Western-Blot Analyse eines Oligo-Pulldown Assays zur Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der κB-Konsensus-Sonde (obere Membran) und der HIV-LTR-Sonde (untere Membran). Es wurde ein Antikörper gegen p65 verwendet. P = GST-PARP-1; I κ B α = GST-I κ B α

5 Diskussion

Seit der Entdeckung der NF- κ B/Rel-Proteine im Jahre 1986 (1) wurde diese Proteinfamilie intensiv erforscht. Denn es wird vermutet, dass NF- κ B ein Schlüsselprotein bei vielen Krankheitsprozessen wie zum Beispiel der Entzündung oder der Krebsentstehung ist (120). Heute sind viele Regulationsmechanismen und Funktionen dieser Proteine bekannt und es werden immer neue Stimuli beschrieben, welche über die Aktivierung von NF- κ B eine Zellantwort auslösen. Auch die Liste der Gene, welche durch NF- κ B reguliert werden, wird ständig erweitert. Noch wenig bekannt ist allerdings über die Vorgänge vom Zeitpunkt der Bindung von NF- κ B an seine Promotorsequenz bis zum Start der Transkription des entsprechenden Gens. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Oligo-Pulldown Assay zu einem einfachen Versuchssystem weiterentwickelt, welches es ermöglichte, diese Vorgänge zu erforschen. Dazu wurde diese Arbeit in folgende Teile gegliedert: Im ersten Schritt wurden verschiedene Zelllinien ausgewählt und in diesen mit geeigneten Stimuli die Induktion von NF- κ B bewirkt. Anschliessend wurde der Oligo-Pulldown Assay für verschiedene DNS-Sonden optimiert. Mit dem Oligo-Pulldown Assay wurden Enhanceosomen aus drei unterschiedlichen menschlichen Zelllinien mit zwei verschiedenen Promotorsequenzen isoliert und analysiert. Jene Proteinbanden, welche eine NF- κ B-Abhängigkeit zeigten, wurden mittels Massenspektrometrie untersucht. Zum Schluss konnte gezeigt werden, dass sich der Oligo-Pulldown Assay auch zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen am Ort des Promotors eines Gens eignete, und die Frage beantwortet werden, ob I κ B α in der Lage ist, NF- κ B von seiner Bindungssequenz zu entfernen.

5.1 Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien

Um NF- κ B-abhängige Enhanceosomen mit dem Oligo-Pulldown Assay isolieren zu können, musste in den eingesetzten nukleären Zellextrakten so viel NF- κ B wie möglich in aktiver Form vorliegen. In den folgenden menschlichen Krebszelllinien konnte die Aktivität von NF- κ B induziert werden: In HeLa Zellen (Zervixkarzinomzellen), THP-1 Monozyten und Jurkat T-Lymphozyten. Zusätzlich wurde die Hodgkin-Krebszelllinie (B-Lymphozyten) eingesetzt, da in dieser NF- κ B auch ohne Stimulation eine hohe Aktivität aufweist.

HeLa Zellen wurden mit Etoposid (20 μ M, 2 h) oder UV-Strahlung (30 mJ/cm²) stimuliert. Obwohl bei diesen Bedingungen eine starke Translokation von NF- κ B in den Zellkern erzielt wurde, erwies sich diese Zelllinie als ungeeignet für den Oligo-Pulldown Assay, weil NF- κ B bereits im unstimulierten Zustand in hoher Konzentration und in aktiver Form im Zellkern vorlag. Für die Auswertung der Versuche mit den TLR-2- und den HIV-LTR-Sonden wurde

aber zusätzlich zu den stimulierten Zellextrakten eine Zellextraktkontrolle mit tiefer nukleärer NF- κ B-Aktivität benötigt.

Da es sich bei den THP-1 Zellen um eine Monozytenzelllinie handelt, konnten sie sich durch Stimulation mit PMA (200 nM, 48 h) zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren. Nach diesem Schritt war nur ein geringer Anstieg von p50 im Zellkern zu beobachten. Erst nach zusätzlicher Stimulation mit LPS (5 μ g/ml, 2 h), stieg die Menge an p65/p50 im Zellkern stark an. Demzufolge war NF- κ B in den THP-1 Zellen mit einer Kombination von PMA und LPS ausgezeichnet induzierbar. Diese Beobachtungen decken sich mit den von Azuma, 2002 (117) publizierten Resultaten.

Jurkat Zellen, welche mit PMA stimuliert wurden (100 nM), zeigten bereits nach 10 min eine deutliche Zunahme von p65/p50 im Zellkern. Mit längerer Stimulation nahm die nukleäre Konzentration dieser beiden Proteine stetig ab. Wurden die Zellen nach 4-stündiger PMA-Stimulation zusätzlich mit LPS stimuliert (5 μ g/ml, 1 h), so stieg die Menge an p65/p50 im Zellkern wieder stark an. Auch in dieser Zelllinie erwies sich NF- κ B als gut induzierbar.

5.2 Optimierung des Oligo-Pulldown Assays

In früheren Arbeiten wurde die Bindungsaffinität von Proteinen zu spezifischen DNS-Sequenzen, welche an Beads gekoppelt waren, dazu benutzt, um diese Proteine entweder zu isolieren oder um die Charakteristika ihrer Bindungsaffinität genauer zu erforschen (121-124). Es wurden DNS-Affinitätsreinigungsmethoden entwickelt, mit denen Transkriptionsfaktoren aus vorgereinigten Extrakten durch Bindung an ihre spezifische Promotorsequenz isoliert werden konnten (121). Diese Methoden wurden zu einem einfachen und wenig arbeitsintensiven Versuchssystem weiterentwickelt, mit dem NF- κ B-abhängige Enhanceosomen mittels einer DNS-Sonde aus nukleären Zellextrakten isoliert werden konnten. Dieses Versuchssystem unterschied sich in mehreren essentiellen Punkten, welche bei der Weiterentwicklung des Oligo-Pulldown Assays berücksichtigt werden mussten, von den herkömmlichen Methoden:

1. Die Proteine des Zielkomplexes und deren Bindungseigenschaften waren abgesehen von NF- κ B unbekannt.
2. Es sollte ein möglichst komplettes Enhanceosom und nicht nur ein einzelner Transkriptionsfaktor isoliert werden.
3. Der nukleäre Zellextrakt durfte nicht vorgereinigt sein, um keine potentiellen Bindungspartner von NF- κ B zu verlieren.
4. Durch die Versuchsbedingungen des Oligo-Pulldown Assays durften Protein-Protein-Interaktionen im Enhanceosom nicht gestört werden, um dieses so vollständig wie möglich zu isolieren.

Der Oligo-Pulldown Assay besitzt mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden zur Analyse von Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel der Immunpräzipitation von Proteinen mittels Antikörpern. Während bei einer Immunpräzipitation das Zielprotein direkt vom Antikörper, welcher an Beads gekoppelt ist, durch Protein-Protein-Interaktion gebunden wird und dadurch unter Umständen Bindungspartner des Zielproteins verdrängt werden, kann dieses Problem beim Oligo-Pulldown Assay vermieden werden. Auch werden durch die DNS-Protein-Interaktion Konformationsänderungen in den Transkriptionsfaktoren induziert, welche deren Interaktionseigenschaften und damit die Zusammensetzung des Enhanceosoms beeinflussen können. Deshalb ist es für die Analyse von Enhanceosomen wichtig, dass diese in Anwesenheit von DNS isoliert werden, damit sie möglichst in ihrer natürlichen Zusammensetzung vorliegen. Der grösste Nachteil der Immunpräzipitation liegt jedoch in der Tatsache, dass die Isolierung des Zielproteins anhand seiner strukturellen Merkmale erfolgt und nicht, wie beim Oligo-Pulldown Assay, anhand seiner funktionellen Eigenschaften als Transkriptionsfaktor. Mit dem Oligo-Pulldown Assay können auch Komponenten des Enhanceosoms nachgewiesen werden, welche entweder nicht direkt an den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor binden oder, wie oben erwähnt, nur mit diesem interagieren, wenn er an die DNS gebunden und in aktiver Form vorliegt. Zusammenfassend können mittels Immunpräzipitation nur direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Ob diese allerdings am Ort des Promotors oder auf einer anderen Ebene der Aktivierungskaskade *in vivo* eine Rolle spielen, kann damit nicht beantwortet werden. Das System des Oligo-Pulldown Assays sollte deshalb die Vorgänge am Promotor aus einem anderen Blickwinkel beleuchten und so zum Verständnis des Aufbaus von Enhanceosomen beitragen.

Das System des Oligo-Pulldown Assays wurde stufenweise optimiert. In einem ersten Schritt konnte NF- κ B mit einer synthetischen NF- κ B-Konsensussequenz als DNS-Sonde aus nukleärem Zellextrakt isoliert und die Spezifität dieser Bindung folgendermassen nachgewiesen werden: War die κ B-Konsensus-Sequenz zusätzlich zur DNS-Sonde in freier Form und im Überschuss im Reaktionsgemisch vorhanden, konnte kein p65/p50 mit der Sonde isoliert werden. Im Gegensatz dazu wurde die Bindung von p65/p50 an seine Bindungssequenz durch einen Überschuss einer an drei Basen mutierten NF- κ B-Bindungssequenz nicht beeinflusst. Wurde hingegen die mutierte NF- κ B-Bindungssequenz als DNS-Sonde eingesetzt, wurde die Bindung wiederum verhindert.

Trotz der guten Bindungsspezifität von NF- κ B an der κ B-Konsensus-Sonde, zeigte diese Sonde mehrere Nachteile. Einerseits war sie sehr kurz, wodurch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Bindung der Proteine durch die Nähe zu den magnetischen Beads möglicherweise negativ beeinflusst wurde. Andererseits enthielt diese Sonde nur zwei kurze κ B-Konsensus-Sequenzen aus NF- κ B-abhängigen Promotoren. Da in natürlichen Promotoren aber immer Bindungssequenzen für diverse Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, wird angenommen, dass die Kombination dieser Sequenzen in der Promotorregion die Zusammensetzung des Enhanceosoms entscheidend beeinflusst. Als zweiter Faktor spielt der Aktivierungsstatus der Zelle und damit auch der einzelnen Transkriptionsfaktoren eine wesentliche Rolle. Im Oligo-Pulldown Assay konnten diese beiden Parameter durch die Wahl der nukleären Zellextrakte (siehe Kapitel „Induktion von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien“) und durch den Einsatz von geeigneten Promotorsequenzen als DNS-Sonden beeinflusst werden. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt Ausschnitte aus zwei natürlich vorkommenden Promotorsequenzen (TLR-2-Promotor und HIV-LTR) als DNS-Sonden gewählt. Diese unterschieden sich bezüglich Länge und Zusammensetzung der Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren voneinander. Es zeigte sich, dass die Reaktionsbedingungen für die κ B-Konsensus-Sonde nicht für die viel längeren TLR-2- und HIV-LTR-Sonden übernommen werden konnten. Aus diesem Grunde mussten folgende Parameter für den Oligo-Pulldown Assay mit den langen DNS-Sonden optimiert werden: Die Bindungsbedingungen (pH-Wert und Salzkonzentration des Bindungspuffers, Inkubationstemperatur und -zeit), die Waschbedingungen (pH-Wert und Salzkonzentration des Waschpuffers), die Art der Kompetitor-DNS und das Verhältnis von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde.

Die Bindungsfähigkeit von NF- κ B an die DNS-Sonde wurde massgeblich durch den pH-Wert und die Salzkonzentration im Bindungspuffer beeinflusst. Die Wahl der Inkubationsbedingungen hingegen hatte im Bereich der getesteten Temperaturen und Zeiten einen wesentlich geringeren Einfluss. Eine tiefere Inkubationstemperatur konnte zudem durch eine längere Inkubationszeit kompensiert werden. Mit den optimierten Bindungsbedingungen konnte NF- κ B spezifisch an die DNS-Sonden gebunden werden. Analysen mit durch Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zeigten jedoch, dass viele unspezifisch an die DNS bindende Proteine ebenfalls mitisoliert wurden. Als wirksamste Methode, um diese Proteine von den DNS-Sonden fernzuhalten, erwies sich die Zugabe von geeigneter Kompetitor-DNS zum Reaktionsgemisch. Die Bindung von NF- κ B an seine Bindungssequenz auf der DNS-Sonde durfte dabei keinesfalls behindert werden. Eine Kompetitor-DNS von ähnlicher Länge wie die DNS-Sonden zeigte einen viel grösseren Effekt als eine zehnmal längere DNS. Die Reduktion der unspezifisch an die DNS-Sonden bindenden Proteine war proportional zur Menge an zugegebener Kompetitor-DNS. Wegen dem grossen Aufwand bei der Herstellung dieser Kompetitor-DNS wurde als maximale Menge im Reaktionsgemisch ein 44-facher Überschuss

gegenüber der DNS-Sonde eingesetzt. Als weiteres Mittel, um die Bindung der unspezifischen Proteine an die DNS-Sonde zu minimieren, wurde die Salzkonzentration im Waschpuffer soweit wie möglich erhöht, ohne dass NF- κ B von der DNS gelöst wurde. Diese Massnahme zeigte aber nur einen geringen Effekt auf die Reduktion der unspezifisch bindenden Proteine.

Alle Versuchsparameter wurden für die Isolierung von p65/p50-Dimeren optimiert. Für die Isolierung von anderen NF- κ B-Dimeren müsste der Oligo-Pulldown Assay möglicherweise wiederum optimiert werden. Zusammenfassend erwiesen sich folgende Bedingungen für den Oligo-Pulldown Assay mit den TLR-2- und HIV-LTR-Sonden zur Isolierung von NF- κ B (p65/p50-Dimeren) als optimal:

- Bindungsbedingungen: Inkubationstemperatur: 30 °C, Inkubationszeit: 3 h
pH-Wert des Bindungspuffers: pH 7.0
Salzkonzentration im Bindungspuffer: 150 mM
- Waschbedingungen: pH-Wert im Waschpuffer: pH 7.0
Salzkonzentration im Waschpuffer: 190 mM
- Art der Kompetitor-DNS: pGL3-Kompetitor (402 bp)
- Verhältnis von Kompetitor-DNS zu DNS-Sonde: 44:1

Durch die Wahl dieser Bedingungen konnte erzielt werden, dass die Bindung von p65/p50 an die TLR-2- und HIV-LTR-Sonden im Oligo-Pulldown Assay äusserst spezifisch war. In den Silbergelanalysen wurden trotzdem viele Proteinbanden beobachtet, welche von unspezifisch an die DNS bindenden Proteinen herrührten. Dennoch konnte in induzierten THP-1 und Jurkat Zellen mit den TLR-2- und HIV-LTR-Sonden eine NF- κ B-Abhängigkeit des Bandenmusters festgestellt werden. Für die Massenspektrometrieanalyse wurden mehrere dieser Proteinbanden aus den Silbergelen ausgeschnitten. Es musste aber angenommen werden, dass zahlreiche NF- κ B-abhängige Proteinbanden auf den mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen nicht sichtbar waren, weil sie durch unspezifische Proteinbanden überdeckt wurden. So konnten auf den Silbergelen auch keine Proteinbanden nachgewiesen werden, welche p65 und p50 entsprachen, weil auf der Höhe von 65 kDa eine sehr prominente und auf der Höhe von 50 kDa eine deutliche unspezifische Proteinbande verlief.

5.3 Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden

Mit der Massenspektrometrieanalyse von neun Proteinbanden aus mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen wurden in zwei Banden die menschlichen Proteine „KIAA1455“ (Bande #3) beziehungsweise „Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)“ (Bande #9) nachgewiesen. Das Protein „KIAA1455“ wurde im Jahre 2000 indirekt über die Identifizierung des entsprechenden Gens entdeckt, welches für ein 1769 Aminosäuren langes Protein kodiert (118). Dies entspricht einem Molekulargewicht von 195 kDa, wohingegen die ausgeschnittene Bande 80 kDa entsprach. Dieser Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass dieses Protein nach der Translation proteolytisch gespalten und deshalb nur ein Teil davon mit der κ B-HIV-LTR-Sonde isoliert wurde. Das Gen des Proteins „Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)“ wurde im Jahre 2002 zum ersten Mal im Rahmen der Herstellung von mehr als 15'000 cDNS-Sequenzen beschrieben (119). Dieses Protein besteht aus 707 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 78 kDa entspricht. Das Protein wurde mit dem Oligo-Pulldown Assay mit der κ B-HIV-LTR-Sonde aus dem nukleären Zellextrakt von THP-1 Zellen isoliert und bei einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa aus dem Silbergel ausgeschnitten. Dieses höhere Molekulargewicht könnte mit einer posttranslationellen Modifikation des Proteins erklärt werden (zum Beispiel Phosphorylierung oder Azetylierung). Die Funktion dieser beiden Proteine und ihre mögliche Bedeutung im Zusammenhang mit NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen ist noch unklar. Diese müssen in Zukunft durch weitere Versuche untersucht werden, wie zum Beispiel durch die Überexpression dieser Proteine in einer Zellkultur oder durch die Herstellung von Knockout-Zellen, in welchen die Gene für diese Proteine deletiert sind. Mittels der Messung der NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen könnte bestimmt werden, ob die Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen beeinflusst wird. Eine andere Möglichkeit bietet die Untersuchung von Protein-Protein- beziehungsweise von DNS-Protein-Interaktionen mittels Immunpräzipitation oder Oligo-Pulldown Assay in Kombination mit der Western-Blot Analyse. Dazu müssten allerdings spezifische Antikörper gegen diese beiden Proteine hergestellt werden.

In sechs weiteren Proteinbanden wurde ausser Keratin kein anderes Protein identifiziert (Banden #1 und #4-8). Das in diesen sechs und in der Bande #9 nachgewiesene menschliche Keratin stammte vermutlich von Verunreinigungen des Silbergels oder der Proteinbanden nach dem Ausschneiden. Diese Banden entsprachen alle einem viel höheren Molekulargewicht, als das nachgewiesene Keratin besitzt (44 bis 70 kDa). Im Rahmen der Massenspektrometrieanalyse ist es unvermeidbar, dass Keratin aus der Umgebung mitanalysiert und auch nachgewiesen wird. Die Tatsache, dass in einer Proteinbande gar kein Protein gefunden wurde (Bande #2), spricht allerdings gegen eine übermässige Kontamination der analysierten Silbergele mit Keratin.

Obwohl mit jeder analysierten Bande eine auf dem Silbergel deutlich sichtbare Proteinbande ausgeschnitten wurde, konnten nicht bei allen Banden Proteine nachgewiesen werden. Zwei Gründe könnten dafür verantwortlich sein: Einerseits war das Protein/Gel-Verhältnis bei den 17 cm langen und 1.5 mm dicken SDS-Polyacrylamidgelen möglicherweise zu tief. Mit den kleineren Gelen von 6 cm Länge und 1 mm Dicke wurde zwar ein deutlich besseres Protein/Gel-Verhältnis erreicht, die Auftrennung der Proteinbanden genügte jedoch den Anforderungen der Massenspektrometrie nicht. Andererseits könnten die mit dem Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteine durch die Silberfärbung zu stark im SDS-Polyacrylamidgel fixiert worden sein, was dazu führte, dass die Proteine für die Massenspektrometrieanalyse nicht mehr aus dem Silbergel herausgelöst werden konnten. Dies könnte besonders bei geringen Mengen an Proteinen auf dem SDS-Polyacrylamidgel ein Problem sein, da während der Silberfärbung die zur Visualisierung der Proteine nötige Entwicklungszeit verlängert werden muss.

5.4 Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Promotorsequenz

In diesem Teil des Projektes wurde gezeigt, dass durch I κ B α die Bindung von NF- κ B an dessen Bindungssequenz zwar verhindert werden konnte, I κ B α aber nicht in der Lage war, die Dissoziation von an die DNS gebundenem NF- κ B zu bewirken. Dieses Resultat wurde weder durch die An- beziehungsweise Abwesenheit der Proteine aus dem nukleären Zellextrakt noch durch die Art der DNS-Sonde beeinflusst. Das Ergebnis dieses Experimentes steht im Widerspruch mit dem von einigen Autoren publizierten Modell, dass I κ B α das für die Entfernung von NF- κ B von der DNS verantwortliche Protein sei (12, 62). Diese Unstimmigkeit könnte dadurch erklärt werden, dass I κ B α für die Entfernung von NF- κ B von seiner Bindungssequenz auf Ko-Faktoren angewiesen ist, welche nicht im verwendeten nukleären Zellextrakt vorkamen. Andererseits könnte aber für diesen Schritt ein anderes Protein als I κ B α verantwortlich sein, welches bis heute noch nicht bekannt ist.

Mit diesem Experiment wurde demonstriert, dass sich das Versuchssystem des Oligo-Pulldown Assays auch dazu eignete, Protein-Protein-Interaktionen an der NF- κ B-Bindungssequenz mittels Western-Blot Analysen zu untersuchen. Mit diesem Experiment konnte das für die Dissoziation von NF- κ B von der DNS benötigte Protein zwar nicht bestimmt werden. Der Oligo-Pulldown Assay bietet jedoch die Möglichkeit, in Zukunft Proteine, welche dafür in Frage kommen könnten, in einem einfachen Versuchsansatz gezielt auf diese Funktion zu untersuchen.

5.5 Schlussbemerkung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, für welche Anwendungsbereiche in der Erforschung von NF- κ B sich der Oligo-Pulldown Assay eignet, aber auch wo die Schwierigkeiten dieses Versuchsystems liegen. Bei diesem *in vitro* Versuchsystem können die DNS-Sonde sowie der eingesetzte nukleäre Zellextrakt in beliebiger Weise variiert werden. Zudem kann die Sequenz der DNS-Sonde gezielt mutiert werden und es besteht die Möglichkeit, den Oligo-Pulldown Assay durch den Einsatz von rekombinanten Proteinen zu modifizieren. Dadurch kann der Oligo-Pulldown Assay einfach und individuell an eine Vielzahl von Fragestellungen angepasst werden, was mit der Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Bindungssequenz eindrücklich demonstriert wurde. Da diese Versuche mittels Western-Blot Analyse ausgewertet wurden, konnte von deren hohen Sensitivität und Spezifität bei der Proteindetektion profitiert werden, wodurch auch mit relativ kleinen Proteinmengen aussagekräftige Resultate erzielt werden konnten. Mit der Kombination von Oligo-Pulldown Assay und Silbergelanalysen konnten zwar NF- κ B-abhängige Proteinbandenmuster beobachtet werden. Die Massenspektrometrieanalyse von Proteinbanden aus den mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen brachte jedoch nur teilweise befriedigende Resultate. Dies ist vermutlich in erster Linie auf die geringe Menge an isolierten Proteinen zurückzuführen. Als Nachteil erwies sich auch, dass mit der Silbergelanalyse im Gegensatz zum Western Blot alle mit dem Oligo-Pulldown Assay isolierten Proteine, das heisst auch die unspezifisch an die DNS bindenden Proteine detektiert wurden. Als Folge davon wurden vermutlich einige der NF- κ B-abhängigen Proteinbanden durch unspezifische Banden überdeckt. Die grosse Anzahl an unspezifischen Proteinbanden erschwerte zudem das möglichst präzise Ausschneiden von einzelnen Banden.

Abschliessend kann gesagt werden, dass sich der Oligo-Pulldown Assay in Kombination mit der Western-Blot Analyse hervorragend für die Untersuchung der Mechanismen an NF- κ B-abhängigen Promotoren eignete. Beim Einsatz zur Isolierung von Proteinen für die Massenspektrometrieanalyse wurden jedoch auch die Schwierigkeiten dieses Versuchsystems deutlich. Wegen der Darstellung der interessierenden Proteinbanden mittels Silbergelanalyse erwies sich diese Anwendung des Oligo-Pulldown Assays als eine relativ aufwändige und heikle Methode zur Analyse von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen.

6 Methoden und Material

6.1 Zellkultur

6.1.1 Zelllinien

Folgende vier menschliche Zelllinien wurden für das Dissertationsprojekt verwendet: HeLa, Jurkat, THP-1 und Hodgkin Zellen. HeLa Zellen stammen von einem menschlichen Zervixkarzinom. Sie sind adhäsiv wachsende Gewebszellen und wurden deshalb in Zellkulturschalen vermehrt. Jurkat, THP-1 und Hodgkin Zellen sind Krebszellen, welche von T-Lymphozyten (Jurkat), Monozyten (THP-1) beziehungsweise B-Lymphozyten (Hodgkin) abstammen. Da diese drei Zelllinien natürlicherweise nicht Teil eines Zellverbandes sind, sondern frei im Blut schwimmen, wachsen sie nicht adhäsiv und wurden deshalb in Suspension vermehrt. Monozyten (THP-1 Zellen) sind Vorläuferzellen von Makrophagen und können durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel PMA dazu veranlasst werden, sich zu Makrophagenähnlichen Zellen zu differenzieren. Da Makrophagen zur Ausführung ihrer Funktion vom Blut ins Gewebe auswandern müssen, werden diese Zellen im Verlaufe ihrer Differenzierung adhäsiv. Makrophagen können durch zusätzliche Stimuli, wie zum Beispiel LPS, aktiviert werden. In Hodgkin Zellen ist NF- κ B konstitutiv aktiviert, weshalb sie nicht stimuliert werden mussten.

6.1.2 Kultivierung der Zellen

Jurkat, Hodgkin und THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin) in Zellkulturflaschen kultiviert. Diesem wurden 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälber-Serum (FCS) beigegeben. HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium mit 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS in Zellkulturschalen kultiviert. Alle Zelllinien wurden in einer Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C vermehrt.

6.1.3 Zellstimulation

6.1.3.1 HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden entweder mit UV-Strahlung (30 mJ/cm²) bestrahlt und anschliessend nochmals während 2 h bei 37 °C inkubiert oder mit 20 μ M Etoposid für 2 h beziehungsweise 4 h stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen geerntet.

6.1.3.2 Jurkat Zellen

Jurkat Zellen wurden entweder mit 32 nM PMA für 1 h oder mit 100 nM PMA für 10 min bis 4 h vorbehandelt oder nach einer 4-stündigen Stimulation mit 100 nM PMA zusätzlich mit 5 µg/ml LPS während 1 h inkubiert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen geerntet.

6.1.3.3 THP-1 Zellen

THP-1 Zellen wurden mit 200 nM PMA während 48 h in Zellkulturschalen inkubiert, um sie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Es wurden Kulturschalen verwendet, da Makrophagen sich im Verlauf ihrer Differenzierung an die Schalenoberfläche anheften und später von dieser abgeschabt werden mussten. Je nach Experiment wurden die Makrophagen-ähnlichen Zellen im Anschluss an die PMA-Stimulation zusätzlich während 2 h mit 5 µg/ml LPS aktiviert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen geerntet.

6.1.4 Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten

Das Ziel bei der Präparation der nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakte war es, die Proteine im Zellkern von denen im Zytoplasma zu trennen. Bei der Durchführung musste besonders darauf geachtet werden, dass Handschuhe getragen wurden, um Kontaminationen der Zellextrakte mit Proteinen (v.a. Proteasen und Nukleasen) durch den Experimentator zu vermeiden. Jurkat Zellen wurden bei einer Dichte von $3.5\text{-}4 \times 10^5$ Zellen/ml und die THP-1 Zellen bei $5\text{-}6 \times 10^5$ Zellen/ml stimuliert und im Anschluss an die Stimulation sofort geerntet (siehe unten). Die HeLa Zellen wurden bei einer Konfluenz von mindestens 70 % geerntet. Die Hodgkin Zellen wurden ohne Stimulation bei einer Dichte von $3.5\text{-}4 \times 10^5$ Zellen/ml geerntet.

Um die Zellen zu ernten, wurden jene Zellen, die in Suspension wuchsen (Jurkat T-Lymphozyten, Hodgkin B-Lymphozyten, THP-1 Monozyten), in 50 ml Falcon-tubes transferiert. Bei den HeLa Zellen und den zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzierten THP-1 Zellen, welche beide an der Zellkulturschale anhafteten, wurde zuerst das Medium entfernt und danach 15 ml PBS (pH 7.4) dazugegeben. Die Zellen wurden von den Zellkulturschalen geschabt und ebenfalls in 50 ml Falcon-tubes transferiert. Alle Zelllinien wurden bei Raumtemperatur für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 40 ml PBS (pH 7.4) gewaschen und wiederum bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Anschliessend wurde das Zellpellet in 1 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM PMSF, 5 mM DTT und je 1 µg/ml Pepstatin, Leupeptin und Bestatin) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Eppendorf-tube transferiert und bei 4 °C und 2000 rpm für 1 min zentrifugiert. Um die Zellen ausreichend zu waschen, wurde dieser Schritt danach noch zweimal wiederholt. Das Zellpellet wurde anschliessend in einem dreifachen Volumen (bezogen auf

das Volumen des Pellets) von Puffer A+ resuspendiert (Puffer A mit 0.1 % (v/v) NP-40, beziehungsweise 0.08 % (v/v) NP-40 für Hodgkin Zellen). Da dieser Puffer im Vergleich zum Zellplasma hypoton ist, wurde die äussere Zellmembran während diesem Schritt beschädigt. Unter dem Mikroskop wurde beurteilt, wie weit die Zellyse fortgeschritten war, indem gleiche Teile von Zellen und Trypanblau gemischt wurden (je ein Aliquot von 10 μ l). Sobald die Zytoplasmamembran durchlässig geworden war (erkennbar an der Blaufärbung des Zellkernes), wurde der Lysisschritt durch Zentrifugation beendet (4 °C, 10'000 rpm, 5 min). Der Überstand bildete den zytoplasmatischen Zellextrakt, dessen Salzkonzentration durch Zugabe von 5 M NaCl auf 120 mM erhöht wurde. Das Pellet, in dem sich die Zellkerne befanden, wurde einmal mit Puffer A gewaschen und bei 4 °C und 500 rpm während 1 min zentrifugiert. Dabei wurde das Pellet intakt gelassen. Anschliessend wurde es in einem dreifachen Volumen (bezogen auf das Volumen des Pellets) von Puffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 % (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM DTT und je 1 μ g/ml Pepstatin, Leupeptin und Bestatin) resuspendiert und während 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde bei 4 °C und 14'000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand bildete den nukleären Zellextrakt, dessen Salzkonzentration durch Zugabe von Puffer D (20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM PMSF, 5 mM DTT und je 1 μ g/ml Pepstatin, Leupeptin und Bestatin) auf 120 mM erniedrigt wurde. Die Proteinkonzentrationen der nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakte wurden mittels Bradford Assay gemessen. Anschliessend wurden die Zellextrakte aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei –80 °C gelagert.

6.1.5 Protease-Test der nukleären Zellextrakte

16 μ g nukleärer Zellextrakt wurden während 3 h bei 30 °C inkubiert (entspricht den Inkubationsbedingungen des Oligo-Pulldown Assays) und anschliessend mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Western-Blot Analyse (Antikörper gegen p65 und p50) mit der gleichen Menge an uninkubiertem nukleärem Zellextrakt verglichen. Beurteilt wurde die Abnahme der Signale für p65 und p50.

6.1.6 Nuklease-Test der nukleären Zellextrakte

16 μ g nukleärer Zellextrakt wurden mit 500 ng TLR-2-Sonde während 45 min beziehungsweise 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend auf einem 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt, welches 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid enthielt, und unter UV-Licht analysiert. Beurteilt wurde die Abnahme des Signals der DNS und ein eventuelles Erscheinen von Degradationsprodukten.

6.2 Bakterienkultur

Die für die Herstellung der DNS-Sonden und für die Kompetitor-DNS benötigten Plasmide wurden in Bakterien amplifiziert und aus diesen gereinigt. Folgende Plasmide wurden amplifiziert: Die TLR-2/pGL3- und HIV-LTR/pGL3-Vektoren, deren mutierte Versionen sowie der leere pGL3-Vektor (siehe auch Kapitel „DNS-Sonden und Kompetitor-DNS“).

6.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen

Eine 1 ml Kultur mit LB-Medium (Luria Bertani Medium) ohne Antibiotikum-Zusatz wurde mit einem *Escherichia coli* DH5 α Stamm beimpft und anschliessend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde in eine 100 ml Kultur mit frischem LB-Medium transferiert und wiederum bei 37 °C inkubiert. Von dieser Kultur wurde die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) gemessen. Sobald die Kultur einen OD₆₀₀-Wert zwischen 0.2 und 0.3 erreichte, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm während 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml gekühltem, sterilem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert und während 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wiederum bei 4 °C und 4000 rpm während 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml gekühltem, sterilem CaCl₂ (50 mM) und 750 μ l gekühltem, sterilem 87 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 200 μ l Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei –80 °C gelagert.

6.2.2 Transformation

100 ng des Plasmids wurden mit 100 μ l kompetenten Zellen eines *Escherichia coli* DH5 α Stammes für 10 min bei 4 °C inkubiert und danach während genau 1 min bei 42 °C erhitzt. Nach weiteren 2 min bei 4 °C wurden 800 μ l LB-Medium ohne Antibiotikum dazugegeben und das Gemisch bei 37 °C während 30 min inkubiert. 100 μ l dieses Mixes wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, welche 70 μ g/ml Ampicillin enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.3 Plasmid-Minipräparation

5 ml LB-Medium mit Ampicillin (70 μ g/ml) wurden mit einer Bakterienkolonie von der Platte (siehe oben) inokuliert und für 12 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden in Eppendorf-tubes geerntet, indem sie für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 250 μ l Puffer P1 (kommerziell erhältlicher Puffer von Qiagen) durch vorsichtiges Schütteln vollständig resuspendiert. 250 μ l Puffer P2 (von Qiagen) wurden dazugegeben und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden sie mehrere Male vorsichtig gekippt. 300 μ l gekühlter Puffer P3 (von Qiagen) wurden

hinzugefügt und die Proben für 10 min bei 4 °C inkubiert. Sie wurden wiederum mehrmals sorgfältig gekippt. Anschliessend wurden sie bei 4 °C und 14'000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-tube transferiert und das Pellet verworfen. 560 µl Isopropanol (0.7-faches Volumen des Überstandes) wurden dazugegeben um die Plasmid-DNS zu präzipitieren und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurden die Eppendorf-tubes während dieser Inkubation wiederholt gekippt. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 14'000 rpm, 10 min) und der Überstand weggeschüttet. Das Pellet, in welchem sich nun die Plasmid-DNS befand, wurde mit 800 µl 70 % (v/v) Äthanol (gekühlt) für 5 min gewaschen (Inkubation auf Eis). Nach Zentrifugation (4 °C, 14'000 rpm, 10 min) wurde der Überstand wiederum weggeschüttet und das Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert und die Plasmid-DNS bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C gelagert.

6.3 DNS-Sonden und Kompetitor-DNS

Zur Isolierung von Enhanceosomen aus nukleären Zellextrakten wurden drei Sets von DNS-Sonden verwendet: Eine synthetisch hergestellte κ B-Konsensus-Sequenz (45 bp) und Ausschnitte der natürlich vorkommenden Sequenzen des Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2) von der Maus und des long terminal repeat des menschlichen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-LTR). Jedes Set bestand je aus der ursprünglichen Form und aus verschiedenen mutierten Sequenzen, bei welchen die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B beziehungsweise Sp1 mutiert waren. Mit den synthetischen Oligonukleotiden wurden zusätzlich zu den κ B- beziehungsweise $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonden auch κ B- beziehungsweise $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS hergestellt. Diese Kompetitor-DNS zeichnete sich dadurch aus, dass sie nicht biotinyliert war, ansonsten aber eine identische Sequenz wie die entsprechende Konsensus-Sonde aufwies.

6.3.1 Die κ B-Konsensus-Sonden und die κ B-Kompetitor-DNS

Es wurde eine kurze synthetische κ B-Konsensus-Sonde mit einer Länge von 45 bp entworfen, welche zwei NF- κ B-Bindungssequenzen enthielt. Davon ausgehend wurde eine $\Delta\kappa$ B-Doppelmutante konzipiert. Jede Sonde bestand aus zwei komplementären Oligonukleotiden, welche bei der Firma Microsynth bestellt wurden (siehe Tabelle 4).

Die sense-Oligonukleotide wurden sowohl als 5'-biotinylierte, als auch als unbiotinylierte Sequenzen bestellt. Die Oligonukleotide κ B-Konsensus-sB und κ B-Konsensus-s wurden je mit κ B-Konsensus-as zur biotinylierten κ B-Konsensus-Sonde beziehungsweise zur κ B-Kompetitor-DNS hybridisiert. Analog dazu wurden die Oligonukleotide $\Delta\kappa$ B-dm-sB und $\Delta\kappa$ B-dm-s je mit $\Delta\kappa$ B-dm-as zur biotinylierten $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonde beziehungsweise zur $\Delta\kappa$ B-Kompe-

titor-DNS hybridisiert (siehe Kapitel „Annealen der κ B-/ $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonden und κ B/ $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS“). Da die sense-Oligonukleotide auf der 5'-Seite zwei Basen länger waren, als die antisense, entstand beim Annealen eine doppelsträngige DNS-Sequenz, welche auf der Seite, auf welcher das Biotin lokalisiert war, zwei einzelsträngige überstehende Basen aufwies.

Tabelle 4 Die κ B-Konsensus-Sequenzen im Überblick

Name	Länge (bp)	Sequenz
κ B-Konsensus-sB	45	5'- <i>Biotin</i> - GTC GAC TCG AGC TCG GGA CTT TCC AGC TGG GAC TTT CCT GCA TGC-3'
κ B-Konsensus-s	45	5'- GTC GAC TCG AGC TCG GGA CTT TCC AGC TGG GAC TTT CCT GCA TGC-3'
κ B-dm-sB	45	5'- <i>Biotin</i> - GTC GAC TCG AGC TCG CTA TTA GAC AGC TGC TAT TAG ACT GCA TGC-3'
κ B-dm-s	45	5'- GTC GAC TCG AGC TCG CTA TTA GAC AGC TGC TAT TAG ACT GCA TGC-3'
κ B-Konsensus-as	43	5'- GCA TGC AGG AAA GTC CCA GCT GGA AAG TCC CGA GCT CGA GTC G-3'
κ B-dm-as	43	5'- GCA TGC AGT CTA ATA GCA GCT GTC TAA TAG CGA GCT CGA GTC G-3'

s = sense; as = antisense; dm = Doppelmutante; B = biotinyliert; bp = Längenangabe in Basenpaaren; hellgrau markiert: NF- κ B-Bindungssequenzen; dunkelgrau markiert: mutierte Basen

6.3.2 Die TLR-2-Sonde

Ein Ausschnitt des Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2) Promotors der Maus wurde ebenfalls als DNS-Sonde verwendet (Basenpaare –294 bis +32 vom Transkriptionsstartpunkt des Gens für TLR-2 gerechnet) (Figur 18). Zusätzlich wurden zwei mutierte Promotorausschnitte eingesetzt, in denen entweder die zwei NF- κ B- oder die zwei Sp1-Bindungssequenzen mehrere Punktmutationen aufwiesen (Tabelle 5). Diese TLR-2-Promotorausschnitte, kloniert in pGL3-Vektoren, waren ein Geschenk von P. Hassa (dieses Institut).

Figur 18 Sequenz des TLR-2-Promotorausschnittes (-294 bis +32)

```

5'-ACTCAGCCAA AAGGCGAGCT GGGAGGCAGC TTTCTCTTTA GGACACCTGG
GGAATTCCA CACGGAGCCT CTGGACTTTC AGTTCTGTTT TGCCTGCCCT
NF-κB #2
GTGGCTCCTG CCAGCTCTGA TGCCAGGCTC CGTTCCCCTT GCAGACCCCT
GTGGGCGGCG CTTGCCGCAC CGGGGGCGGT GCTGGCGACC CGGGAAGTTC
Sp1 #2 Sp1 #1
GGGGCCCTGA CCTGGGGACA TCCCCTTCCC TCACTTCCAG GTCTTCAGTC
NF-κB #1
TTCCTAGGCT GGTGCCCAGA TGGCTAGTGG GCACGGGGAG CGGCGGCTGG
+1
AGGACTCCTA GGTAGGTGGA TCGGTC -3'

```

Sequenz des TLR-2-Promotorausschnittes der Maus, welcher als DNS-Sonde verwendet wurde. Die Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF-κB und Sp1 sind grau markiert. Der geknickte Pfeil signalisiert den Startpunkt der Transkription.

Tabelle 5 Die Bindungssequenzen für NF-κB und Sp1 und deren Mutationen in der TLR-2-Sonde

	κB-TLR-2-Sonde	ΔκB-TLR-2-Sonde	ΔSp1-TLR-2-Sonde
NF-κB #2	GGGGAATTCC	GGGTAAGTCA	GGGGAATTCC
Sp1 #2	TGTGGGCGGCGCT	TGTGGGCGGCGCT	TGTGGTCAAGTGCT
Sp1 #1	CGGGGGCGGTGCT	CGGGGGCGGTGCT	CGGTTGAGGTGCT
NF-κB #1	GGGACATCCCCT	TGGCCATACCCT	GGGACATCCCCT

6.3.3 Die HIV-LTR-Sonde

Als dritte DNS-Sonde wurde ein 714 bp langer Ausschnitt aus dem long terminal repeat des menschlichen Immundefizienz-Virus Typ 1 benutzt (HIV-LTR). Auch von dieser Sonde wurde eine mutierte Version eingesetzt, bei der beide NF-κB-Bindungssequenzen mehrere Punktmutationen aufwiesen (Tabelle 6). Diese DNS-Sequenzen waren in pGL3-Vektoren kloniert und waren ein Geschenk von P. Hassa (dieses Institut).

Tabelle 6 Die NF-κB-Bindungssequenzen und deren Mutationen in der HIV-LTR-Sonde

Sonde	NF-κB-Bindungssequenzen
κB-HIV-LTR	(-108) 5'-CAAGGGGACTT TCCGCTGGGG ACTTTCCAGG GAG -3' (-76)
ΔκB-HIV-LTR	(-108) 5'-CAATCTACTT TCCGCTGTCT ACTTTCCAGG GAG -3' (-76)

Die Sequenzen der NF-κB-Bindungsstellen im HIV-LTR sind grau unterlegt. Die Mutationen in der ΔκB-HIV-LTR-Sonde sind dunkelgrau markiert. In Klammern ist die Entfernung bis zum Startpunkt der Transkription angegeben.

6.3.4 Annealen der κ B-/ $\Delta\kappa$ B-Konsensus-Sonden und κ B-/ $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS

Das Annealen der komplementären Oligonukleotide wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt je 25 μ g der beiden komplementären Oligonukleotide in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA), welcher zusätzlich 500 mM NaCl enthält. Dabei wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam über mehrere Stunden auf 4 °C abgekühlt und bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration der doppelsträngigen DNS betrug 1 μ g/ μ l.

6.3.5 Linearisierung des leeren pGL3-Vektors

Der linearisierte pGL3-Vektor (4818 bp) diente beim Oligo-Pulldown Assay als unspezifische Kompetitor-DNS. Der leere pGL3-Vektor wurde wie im Kapitel „Bakterienkultur“ amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaut. Da im ganzen Vektor nur eine Schnittstelle für dieses Enzym vorkommt, wurde er dadurch linearisiert. 20 μ g pGL3-Vektor wurden in 100 μ l des kommerziell erhältlichen Puffers NEB2 (von New England Biology) (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit 44 U Hind III über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration an linearisierter pGL3-DNS betrug 200 ng/ μ l.

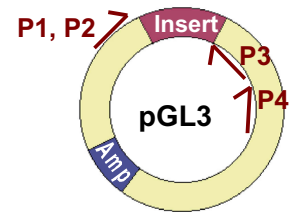
6.3.6 PCR-Amplifikation

Mit der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wurden die TLR-2- und die HIV-LTR-Sonden amplifiziert. Zusätzlich diente leerer pGL3-Vektor als Grundlage für eine Negativkontroll-DNS-Sonde (pGL3-Sonde) und für eine unspezifische Kompetitor-DNS (pGL3-Kompetitor-DNS), welche sich nur darin voneinander unterschieden, dass erstere biotinyliert war und letztere nicht. Die pGL3-Sonde diente bei den Oligo-Pulldown Assays als Negativkontrolle, da sie in etwa die gleiche Länge besass wie die TLR-2-Sonden (Tabelle 7 B), aber keine Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besass.

Für die PCR wurden ausschliesslich Vektorprimer (P1-4) für den pGL3-Vektor verwendet (Tabelle 7 A). Dadurch konnten immer die gleichen vier Primer verwendet werden, unabhängig davon welche Promotorsequenz amplifiziert werden sollte. Da Biotin an den Primer P2 gebunden war, wurden die mit diesem Primer produzierten DNS-Sonden gleichzeitig biotinyliert. Für die pGL3-Sonde und die pGL3-Kompetitor-DNS wurde P4 als 3'-Primer gewählt, weil dieser kombiniert mit Primer P1 beziehungsweise P2 ein Produkt lieferte, dessen Länge ungefähr der Länge der LTR-2 Sonde entsprach (Tabelle 7 B). Primer P1, der im Gegensatz zu Primer P2 nicht biotinyliert war, wurde nur für die pGL3-Kompetitor-DNS verwendet. Alle anderen PCR-Produkte waren biotinyliert. Die PCR-Produkte für DNS-Sonden wurden mit QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Da von der pGL3-Kompetitor-DNS grosse Mengen benötigt wurden, wurde diese nach der PCR-Amplifikation nicht gereinigt. Eine Übersicht über die eingesetzten Primer und Templates geben die Tabellen 7 A und 7 B sowie Figur 19.

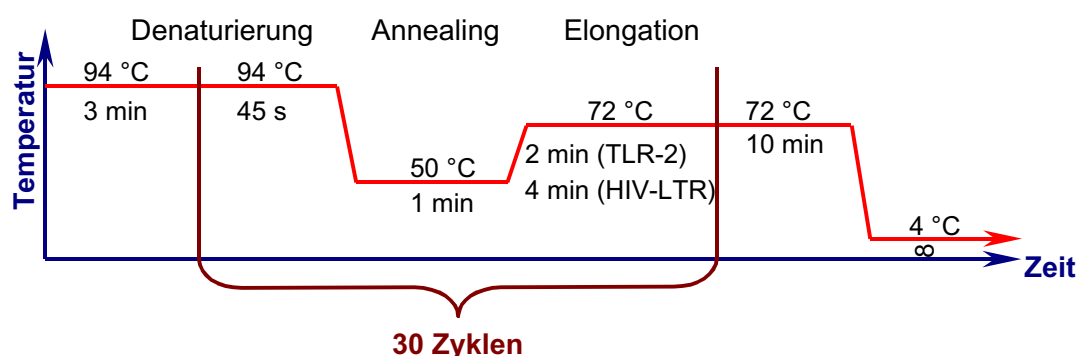
Tabelle 7 A Sequenzen der für die PCR gebrauchten Primer

Primer	Länge	Sequenz
P1	20-mer	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3'
P2	21-mer	5'- <i>Biotin</i> -CTA GCA AAA TAG GCT GTC CCC-3'
P3	23-mer	5'-CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA-3'
P4	21-mer	5'-AGA GAG TTT TCA CTG CAT ACG-3'

Figur 19 PCR-Primer**Tabelle 7 B Übersicht über die eingesetzten Templates**

Template	Primer	Produkt	biotinyliert	Produktgrösse (bp)
κB-TLR-2-pGL3	P2, P3	κB-TLR-2-Sonde	+	475
ΔκB-TLR-2-pGL3	P2, P3	ΔκB-TLR-2-Sonde	+	475
ΔSp-1-TLR-2-pGL3	P2, P3	ΔSp-1-TLR-2-Sonde	+	475
leerer pGL3	P2, P4	pGL3-Sonde	+	402
leerer pGL3	P1, P4	pGL3-Kompetitor	-	402
κB-HIV-pGL3	P2, P3	κB-HIV-LTR-Sonde	+	866
ΔκB-HIV-pGL3	P2, P3	ΔκB-HIV-LTR-Sonde	+	866

Das Reaktionsvolumen für die PCR betrug jeweils 50 µl. Darin waren enthalten: 40 ng Plasmid-Template, je 25 pmol von beiden Primern, 3 U Pfu-Polymerase und je 25 nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der für die PCR verwendete Reaktionspuffer stammte von Promega und enthielt in seiner Endkonzentration 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1 % TritonX-100 und 0.1 mg/ml Nuklease-freies BSA. Die Zyklen, welche für die PCR verwendet wurden, sind in Figur 20 dargestellt. Die Annealing-Temperatur, welche von den eingesetzten Primern abhängig ist, konnte für alle Reaktionen gleich gewählt werden, da die vier verwendeten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur besaßen. Die Elongationszeit hängt hingegen primär von der Länge des Produktes ab, und musste deshalb bei den HIV-LTR-Sonden doppelt so lange gewählt werden wie bei den anderen Produkten.

Figur 20 PCR-Reaktion

Darstellung der PCR-Zyklen, welche für alle Templates weitgehend identisch waren. Einzig die Elongationszeit musste entsprechend der Länge des Produktes angepasst werden.

6.4 Der Oligo-Pulldown Assay

6.4.1 Der Oligo-Pulldown Assay zur Isolierung von NF- κ B-abhängigen Enhanceosomen

Da der Oligo-Pulldown Assay während diesem Dissertationsprojekt optimiert wurde, wurden die Reaktionsbedingungen und -mengen laufend verändert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die optimierten Bedingungen. Wenn im Kapitel „Resultate“ nichts anderes vermerkt ist, wurden diese Konditionen verwendet. Das Gesamtvolumen des Oligo-Pulldown Assays betrug 1 ml für die TLR-2- und die HIV-LTR-Sonden beziehungsweise 200 μ l für die κ B-Konsensus-Sonde. Das Reaktionsgemisch enthielt 80 μ g nukleären Zellextrakt und 60 μ g magnetische Beads in Bindungspuffer (siehe unten). Dieser Reaktionsansatz wurde mit 100 ng κ B-Konsensus-Sonde, 800 ng TLR-2-Sonde oder 1.6 μ g HIV-LTR-Sonde inkubiert. Als unspezifische Kompetitor-DNS wurden zusätzlich 30 μ g pGL3-Kompetitor beziehungsweise 1 μ g poly-dA/oligo-dT dazugegeben. Bei einigen Versuchen mit der κ B-Konsensus-Sonde wurden zusätzlich 1 μ g κ B- beziehungsweise $\Delta\kappa$ B-Kompetitor-DNS dem Reaktionsgemisch beigegeben. Die Beads wurden vor dem Gebrauch in Beadspuffer (siehe unten) äquilibriert.

Die Versuchsansätze wurden in einem 1.5 ml-Eppendorf-tube während 3 h bei 30 °C (TLR-2- und HIV-LTR-Sonden) respektive während 2 h bei 4 °C (κ B-Konsensus-Sonde) inkubiert. Dabei wurden die Proben durch Rotation kontinuierlich gemischt. Anschliessend wurden die Beads dreimal während je 5 min mit 1 ml Waschpuffer (siehe unten) gewaschen, in 25 μ l Ladepuffer resuspendiert und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Die an die DNS gebundenen Proteine wurden dabei denaturiert und lösten sich von der DNS. Nach der Zentrifugation der Proben (10'000 rpm, 30 s) wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Gel) ihrer Grösse nach aufgetrennt.

6.4.2 Der Oligo-Pulldown Assay zur Untersuchung der Interaktion von NF- κ B und I κ B α an der NF- κ B-Bindungssequenz

Der Versuchsablauf entsprach weitgehend dem Oligo-Pulldown Assay, bei welchem die Konsensus-Sonden eingesetzt wurden (siehe oben). Da aber neben der κ B-Konsensus-Sonde (100 ng) auch die viel längere κ B-HIV-LTR-Sonde (2 μ g) verwendet wurde, mussten die Bindungsdauer und -temperatur modifiziert werden: Die Versuchsansätze wurden während 15 h bei 4 °C inkubiert. Als Kompetitor-DNS wurde 1 μ g poly-dA/oligo-dT eingesetzt. Folgende drei Versuchsreihen wurden entworfen: Bei der ersten Versuchsreihe (sim) wurden 20 μ g GST-I κ B α (61 kDa) beziehungsweise 50 μ g GST-PARP-1 (138 kDa) vor der 15-stündigen Inkubation zur Bindungsreaktion gegeben. Nach dem Binden wurden die Versuchsansätze dreimal mit 1 ml Waschpuffer (siehe unten) während je 5 min gewaschen. Bei der

zweiten Versuchsreihe (post nZE-) wurden während der Bindungsdauer keine zusätzlichen Proteine zugegeben. Nach dem Binden wurde der Überstand entfernt, und die Beads dreimal mit 1 ml Waschpuffer während je 5 min gewaschen. Anschliessend wurden die Beads mit 20 µg GST-IκBα beziehungsweise 50 µg GST-PARP-1 in 200 µl Waschpuffer für 1 h inkubiert und schliesslich wiederum dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Bei der dritten Versuchsreihe (post nZE+) wurden 20 µg GST-IκBα beziehungsweise 50 µg GST-PARP-1 nach der 15-stündigen Inkubation direkt der Bindungsreaktion zugegeben und die Versuchsansätze nochmals während 1 h inkubiert. Anschliessend wurden die Beads dreimal während je 5 min mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Bei allen Versuchsansätzen wurden die Beads zum Schluss in 25 µl Ladepuffer resuspendiert und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Nach der Zentrifugation der Proben (10'000 rpm, 30 s) wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Gel) ihrer Grösse nach aufgetrennt.

6.4.3 Puffer für den Oligo-Pulldown Assay

Bindungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0, beziehungsweise pH 8.0 bei der κB-Konsensus-Sonde), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.05 % (v/v) NP-40, 150 mM NaCl beziehungsweise 110 mM bei der κB-Konsensus-Sonde (dabei wurde auch der NaCl-Gehalt des nukleären Zellextraktes von 120 mM berücksichtigt), 5 % (v/v) Glycerin (bei Versuchen mit der κB-Konsensus-Sonde enthielt der Puffer kein Glycerin) und je 1 µg/ml Pepstatin, Leupeptin und Bestatin

Beadspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0, beziehungsweise pH 8.0 bei der κB-Konsensus-Sonde), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.05 % (v/v) NP-40

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0 beziehungsweise pH 8.0 bei der κB-Konsensus-Sonde), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.05 % (v/v) NP-40, 190 mM NaCl beziehungsweise 110 mM bei der κB-Konsensus-Sonde und je 1 µg/ml Pepstatin, Leupeptin und Bestatin

Ladepuffer: (60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) Glycerin, 0.005 % (w/v) Bromphenol-Blau, 2 % (v/v) Merkaptoäthanol, 2.5 mM DTT

6.5 SDS-PAGE

Für die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 7.5 %, 10 % und 12 %-Gele verwendet. Für die meisten Experimente wurden Gele von 8 cm Breite, 6 cm Länge und 1 mm Dicke benutzt. Falls die Proteinbanden mittels Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurden grosse Gele von 16 cm Breite, 17 cm Länge und 1.5 mm Dicke verwendet.

6.6 Western-Blot Analyse

Durch Elektroblothing wurden die Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Diese wurde danach mit 5 % (w/v) in TBST gelöstem Milchpulver geblockt. Es wurden die folgenden Antikörper verwendet: Kaninchen anti-p65-Antikörper (polyklonal), Kaninchen anti-p50-Antikörper (polyklonal), Kaninchen anti-pol II-Antikörper (polyklonal), Maus anti-PARP-1-Antikörper (monoklonal). Die Antikörper wurden 1:500 in TBST mit 2.5 % (w/v) Milchpulver verdünnt. Der sekundäre Antikörper war Peroxidase-konjugiert und wurde 1:10'000 (Esel anti-Kaninchen) beziehungsweise 1:5000 (Schaf anti-Maus) in TBST verdünnt. Die Membranen wurden mit den ECL-Lösungen (Enhanced Chemiluminescence) behandelt. Um die Signale der Proteinbanden zu detektieren, wurde mit den Membranen ein Röntgenfilm belichtet.

6.7 Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 30 min bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) in eine Fixierlösung eingelegt (50 % (v/v) Äthanol, 10 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest). Anschliessend wurde es 15 min lang in 30 % (v/v) Äthanol bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wurde das Gel dreimal für je 5 min mit Aqua bidest. gewaschen. Danach wurde es mit einer 0.02 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) während 1.5 min sensitiviert. Diese Lösung wurde jedesmal frisch zubereitet und eine kleine Menge davon für die Entwickler-Lösung aufbewahrt. Das Gel wurde anschliessend dreimal für je 30 s mit Aqua bidest. gewaschen und während 25 min bei 4 °C mit einer 0.2 % (w/v) Silbernitrat-Lösung gefärbt. Um überschüssiges Silbernitrat zu entfernen, wurde das gefärbte Gel zweimal für je 30 s mit Aqua bidest. bei Raumtemperatur gewaschen. Daraufhin wurde das Gel in einer Lösung entwickelt, welche 6 % (w/v) Natriumkarbonat, 0.05 % (v/v) Formaldehyd und 2 % (v/v) der zuvor benutzten Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung enthielt. Sobald eine genügende Visualisierung der Proteinbanden erreicht war, wurde die Entwicklung mit 6 % (v/v) Essigsäure während 10 min gestoppt. Zum Schluss wurde das Gel mindestens viermal mit Aqua bidest. für je 15 min gewaschen.

6.8 Massenspektrometrieanalyse

Mit der Massenspektrometrie kann die Aminosäuresequenz von Proteinen analysiert werden. Bei der Vorbereitung von Proteinproben, welche mit Massenspektrometrie analysiert werden sollten, musste deshalb jede Kontamination mit Proteinen aus der Umgebung und durch den Experimentator (v.a. Keratin) vermieden werden. Aus diesem Grunde mussten bei allen Versuchsschritten unbedingt Handschuhe getragen werden. Alle Instrumente und Apparaturen, die mit dem Gel direkt in Berührung kamen, im Besonderen die Gelapparatur selbst, wurden vor dem Gebrauch gründlich mit frischem Aqua bidest. gespült. Für die Zubereitung der SDS-Polyacrylamidgele wurden frisches Acrylamid und HPLC-Wasser verwendet. Zur Herstellung des Elektrophorese-Laufpuffers und der Lösungen für die Silberfärbung des Gels wurde ausschliesslich frisches Aqua bidest. eingesetzt. Für die Massenspektrometrieanalyse wurden Proteinbanden von maximal 1.5 mm Länge mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die Klinge wurde nach jedem Schnitt gründlich mit frischem Aqua bidest. gespült. Nach dem Ausschneiden wurden die Gelstücke bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und auf Trockeneis verschickt. Die Massenspektrometrieanalysen wurden teilweise von Dr. M. Quadroni am Institut de Biochimie der Universität Lausanne und teilweise von R. Imhof am Functional Genomics Center Zürich durchgeführt. Einen Überblick über das Prinzip der Massenspektrometrieanalyse gibt die Arbeit von Aebersold, 2003 (125).

6.9 Materialliste

Allgemeine Chemikalien

Äthanol	Merck
Bestatin	Bachem (F1215)
Bradford Assay-Lösung	Bio-Rad
Bromphenol-Blau	Sigma
DTT	Fluka
EDTA	Fluka
Essigsäure	Erne-Chemie
Formaldehyd	Fluka
Glycerin	Fluka
HCl	Merck
Isopropanol	Merck
KCl	Fluka
Leupeptin	Bachem (N1000)
Merkaptoäthanol	Fluka
Milchpulver	Migros
MgCl ₂	Fluka
NaCl	Fluka
Na ₂ CO ₃	Fluka
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	Fluka
HPLC-Wasser	Merck
NP-40	Fluka
Pepstatin	Bachem (N1125)
PMSF	Fluka
SDS	Fluka
Silbernitrat	Fluka
Tris	Biosolve
Trypanblau	Sigma
Tween	Fluka

Zellkultur und Zellstimulation

DMEM-Medium	Invitrogen
Etoposid	Sigma (E1383)
FCS	Invitrogen
LPS	Sigma (L6143)
Penicillin G	Invitrogen
PMA	Alexis (445-004)
RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I	Invitrogen
Streptomycin	Invitrogen
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner

Präparation der DNS-Sonden

Ampicillin	Fluka
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen
Hind III	New England Biology
HIV-LTR/pGL3	P. Hassa (dieses Institut)
LB-Medium Kapseln	Q-BIOgene
oligo-dT	Amersham
Oligonukleotide	Microsynth

PCR Reaktionspuffer	Promega
Pfu-Polymerase	Promega
pGL3-Vektor	Promega
poly-dA	Amersham
Primer	Microsynth
Puffer NEB2	New England Biology
Puffer P1	Qiagen
Puffer P2	Qiagen
Puffer P3	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TLR-2/pGL3	P. Hassa (dieses Institut)

Oligo-Pulldown Assay, Western-Blot Analyse und Silberfärbung

Acrylamid 37.5:1	Serva
Dynabeads M-280	Dynal
ECL-Lösung	Pierce
Esel anti-Kaninchen-Antikörper	Amersham
GST-IκBα	an diesem Institut hergestellt und gereinigt
GST-PARP-1	an diesem Institut hergestellt und gereinigt
Kaninchen anti-p50-Antikörper (polyklonal)	Santa Cruz
Kaninchen anti-p65-Antikörper (polyklonal)	Santa Cruz
Kaninchen anti-pol II-Antikörper (polyklonal)	Santa Cruz
Maus anti-PARP-1-Antikörper (monoklonal)	P. Hassa (dieses Institut)
Nitrozellulose-Membran	Osmonics
Proteinmarker	Amersham
Schaf anti-Maus-Antikörper	Amersham

6.10 Geräteliste

Gelapparaturen	Bio-Rad
Heizblock	Techne Dri-block DB-2D
Inkubator (30 °C)	Bachofer, MINI-Hybi (9520091)
Inkubator für Bakterienkulturen	Lab Therm, Kühner und Heraeus
Magnet	Dynal
Mikrowellengerät	König
PCR Maschine	Perkin-Elmer
pH-Meter	Metrohm
Pipetman	Gilson
Power Supply Model 200 / 2.0	BioRad
Röntgenfilm (Super RX-Film)	Fuji
Röntgenfilm-Prozessor (FPM 100A)	Fuji
Röntgenfilm-Kassette	Okamoto
Shaker / roller shaker	Heidolph / Greiner
UV-Licht Spektrometer	Shimadzu
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortex Genie	Bender & Hobein AG
Waagen	Mettler
Wasserbad (37 °C)	GFL
Western-Blot Apparaturen	Bio-Rad
White/UV transilluminator	UVP
Zentrifuge Rotanta 460 (Zellkultur)	Hettich
Zentrifuge Rotanta P (Bakterienkultur)	Hettich
Zentrifugen für Eppendorf-tubes	Eppendorf 5417R, 5417C (Rotor F 45-30-11)

7 Literaturverzeichnis

1. **Sen R., Baltimore D.** (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705-716
2. **Barkett M., Gilmore T.D.** (1999) Control of apoptosis by Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-6924
3. **Rayet B., Gelinas C.** (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, **18**, 6938-6947
4. **Brooks P.A., Nyborg J.K., Cockerell G.L.** (1995) Identification of an NF-kappa B binding site in the bovine leukemia virus promoter. *J Virol*, **69**, 6005-6009
5. **Flory E., Kunz M., Scheller C., Jassoy C., Stauber R., Rapp U.R., Ludwig S.** (2000) Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem*, **275**, 8307-8314
6. **Oie K.L., Pickup D.J.** (2001) Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. *Virology*, **288**, 175-187
7. **Kilk A., Talpsepp T., Vali U., Ustav M.** (1996) Bovine papillomavirus oncoprotein E5 induces the NF kappa B activation through superoxide radicals. *Biochem Mol Biol Int*, **40**, 689-697
8. **Miyamoto S., Verma I.M.** (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res*, **66**, 255-292
9. **Baldwin A.S. Jr.** (1996) The NF-kappaB and IkappaB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683
10. **Govind S., Steward R.** (1991) Dorsoventral pattern formation in Drosophila: signal transduction and nuclear targeting. *Trends Genet*, **7**, 119-125
11. **Hedengren M., Asling B., Dushay M.S., Ando I., Ekengren S., Wihlborg M., Hultmark D.** (1999) Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in Drosophila. *Mol Cell*, **4**, 827-837
12. **Karin M., Ben-Neriah Y.** (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663
13. **Phelps C.B., Sengchanthalangsy L.L., Malek S., Ghosh G.** (2000) Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers. *J Biol Chem*, **275**, 24392-24399
14. **Schmitz M.L., Baeuerle P.A.** (1991) The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.*, **10**, 3805-3817
15. **Franzoso G., Bours V., Park S., Tomita-Yamaguchi M., Kelly K., Siebenlist U.** (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature*, **359**, 339-342
16. **Harhaj E.W., Sun S.C.** (1999) Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol*, **19**, 7088-7095
17. **Yamazaki S., Muta T., Takeshige K.** (2001) A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, **276**, 27657-27662
18. **Rubtsov A.M., Lopina O.D.** (2000) Ankyrins. *FEBS Lett*, **482**, 1-5
19. **Beg A.A., Ruben S.M., Scheinman R.I., Haskill S., Rosen C.A., Baldwin A.S. Jr.** (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev*, **6**, 1899-1913

20. **Ganchi P.A., Sun S.C., Greene W.C., Ballard D.W.** (1992) I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell*, **3**, 1339-1352
21. **Inoue J., Kerr L.D., Kakizuka A., Verma I.M.** (1992) I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell*, **68**, 1109-1120
22. **Henkel T., Zabel U., van Zee K., Muller J.M., Fanning E., Baeuerle P.A.** (1992) Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell*, **68**, 1121-1133
23. **Siebenlist U., Franzoso G., Brown K.** (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 405-455
24. **Zhang Q., Didonato J.A., Karin M., McKeithan T.W.** (1994) BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol Cell Biol*, **14**, 3915-3926
25. **Chen F.E., Huang D.B., Chen Y.Q., Ghosh G.** (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*, **391**, 410-413
26. **Muller C.W., Rey F.A., Sodeoka M., Verdine G.L., Harrison S.C.** (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*, **373**, 311-317
27. **Busam K., Gieringer C., Freudenberg M., Hohmann H.P.** (1992) Staphylococcus aureus and derived exotoxins induce nuclear factor kappa B-like activity in murine bone marrow macrophages. *Infect Immun*, **60**, 2008-2015
28. **Sen R., Baltimore D.** (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**, 921-928
29. **Wang Q., Dziarski R., Kirschning C.J., Muzio M., Gupta D.** (2001) Micrococci and peptidoglycan activate TLR2→MyD88→IRAK→TRAF→NIK→IKK→NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun*, **69**, 2270-2276
30. **Pahl H.L., Baeuerle P.A.** (1995) Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J Virol*, **69**, 1480-1484
31. **Bachelier F., Alami J., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L.** (1991) HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa B induction on infection of monocytes. *Nature*, **350**, 709-712
32. **Zhu Z., Tang W., Ray A., Wu Y., Einarsson O., Landry M.L., Gwaltney J. Jr., Elias J.A.** (1996) Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro: evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest*, **97**, 421-430
33. **Bertrand F., Philippe C., Antoine P.J., Baud L., Groyer A., Capeau J., Cherqui G.** (1995) Insulin activates nuclear factor kappa B in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway. *J Biol Chem*, **270**, 24435-24441
34. **Smith C.S., Shearer W.T.** (1994) Activation of NF-kappa B and immunoglobulin expression in response to platelet-activating factor in a human B cell line. *Cell Immunol*, **155**, 292-303
35. **Mutoh H., Ishii S., Izumi T., Kato S., Shimizu T.** (1994) Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 1137-1142
36. **Digicaylioglu M., Lipton S.A.** (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, **412**, 641-647

37. **Schwaninger M., Sallmann S., Petersen N., Schneider A., Prinz S., Libermann T.A., Spranger M.** (1999) Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem*, **73**, 1461-1466
38. **Li J., Brasier A.R.** (1996) Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol*, **10**, 252-264
39. **Gabriel C., Justicia C., Camins A., Planas A.M.** (1999) Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*, **65**, 61-69
40. **Li C., Browder W., Kao R.L.** (1999) Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol*, **276**, H543-552
41. **Stein B., Kramer M., Rahmsdorf H.J., Ponta H., Herrlich P.** (1989) UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J Virol*, **63**, 4540-4544
42. **Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A.** (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, **10**, 2247-2258
43. **Nishikawa M., Kakemizu N., Ito T., Kudo M., Kaneko T., Suzuki M., Udaka N., Ikeda H., Okubo T.** (1999) Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor-kappaB activation and IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**, 189-198
44. **Rahman I., MacNee W.** (1998) Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, **53**, 601-612
45. **Scheinman R.I., Cogswell P.C., Lofquist A.K., Baldwin A.S. Jr.** (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286
46. **De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Plaisance S., Boone E., Haegeman G.** (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3919-3924
47. **Wang P., Wu P., Siegel M.I., Egan R.W., Billah M.M.** (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*, **270**, 9558-9563
48. **Pahl H.L., Krauss B., Schulze-Osthoff K., Decker T., Traenckner E.B., Vogt M., Myers C., Parks T., Warring P., Muhlbacher A., Czernilofsky A.P., Baeuerle P.A.** (1996) The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specially inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med*, **183**, 1829-1840
49. **Jin D.Y., Chae H.Z., Rhee S.G., Jeang K.T.** (1997) Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, **272**, 30952-30961
50. **Pierce J.W., Read M.A., Ding H., Luscinskas F.W., Collins T.** (1996) Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol*, **156**, 3961-3969
51. **Yin M.J., Yamamoto Y., Gaynor R.B.** (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, **396**, 77-80
52. **Meyer S., Kohler N.G., Joly A.** (1997) Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, **413**, 354-358

53. **Dixit V., Mak T.W.** (2002) NF-kappaB signaling: Many roads lead to madrid. *Cell*, **111**, 615-619
54. **Rodriguez M.S., Thompson J., Hay R.T., Dargemont C.** (1999) Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem*, **274**, 9108-9115
55. **Yang J., Lin Y., Guo Z., Cheng J., Huang J., Deng L., Liao W., Chen Z., Liu Z., Su B.** (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*, **7**, 620-624
56. **Shimada T., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Inoue J., Tatsumi Y., Kanamaru A., Akira S.** (1999) IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol*, **11**, 1357-1362
57. **Peters R.T., Liao S.M., Maniatis T.** (2000) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell*, **5**, 513-522
58. **Nomura F., Kawai T., Nakanishi K., Akira S.** (2000) NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells*, **5**, 191-202
59. **Chen Z.J., Parent L., Maniatis T.** (1996) Site-specific phosphorylation of IkappaB alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, **84**, 853-862
60. **Roff M., Thompson J., Rodriguez M.S., Jacque J.M., Baleux F., Arenzana-Seisdedos F., Hay R.T.** (1996) Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J Biol Chem*, **271**, 7844-7850
61. **Baldi L., Brown K., Franzoso G., Siebenlist U.** (1996) Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J Biol Chem*, **271**, 376-379
62. **Chen L.f., Fischle W., Verdin E., Greene W.C.** (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, **293**, 1653-1657
63. **Tam W.F., Lee L.H., Davis L., Sen R.** (2000) Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol*, **20**, 2269-2284
64. **Tian B., Brasier A.R.** (2003) Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res*, **58**, 95-130
65. **van de Stolpe A., Caldenhoven E., Stade B.G., Koenderman L., Raaijmakers J.A., Johnson J.P., van der Saag P.T.** (1994) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem*, **269**, 6185-6192
66. **Iademarco M.F., McQuillan J.J., Rosen G.D., Dean D.C.** (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem*, **267**, 16323-16329
67. **Schwartz M.D., Moore E.E., Moore F.A., Shenkar R., Moine P., Haenel J.B., Abraham E.** (1996) Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, **24**, 1285-1292
68. **Barnes P.J., Adcock I.M.** (1997) NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 46-50
69. **Marok R., Winyard P.G., Coumbe A., Kus M.L., Gaffney K., Blades S., Mapp P.I., Morris C.J., Blake D.R., Kaltschmidt C., Baeuerle P.A.** (1996) Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum*, **39**, 583-591

70. **Miagkov A.V., Kovalenko D.V., Brown C.E., Didsbury J.R., Cogswell J.P., Stimpson S.A., Baldwin A.S., Makarov S.S.** (1998) NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13859-13864
71. **Brand K., Page S., Rogler G., Bartsch A., Brandl R., Knuechel R., Page M., Kaltschmidt C., Baeuerle P.A., Neumeier D.** (1996) Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, **97**, 1715-1722
72. **Schmid R.M., Adler G., Liptay S.** (1998) Activation of NFkappaB in inflammatory bowel disease. *Gut*, **43**, 587-588
73. **van Heel D.A., Udalova I.A., De Silva A.P., McGovern D.P., Kinouchi Y., Hull J., Lench N.J., Cardon L.R. Carey A.H., Jewell D.P., Kwiatkowski D.** (2002) Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet*, **11**, 1281-1289
74. **Neurath M.F., Pettersson S., Meyer zum Buschenfelde K.H., Strober W.** (1996) Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*, **2**, 998-1004
75. **Jany B., Betz R., Schreck R.** (1995) Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur Respir J*, **8**, 387-391
76. **Sakurai H., Hisada Y., Ueno M., Sugiura M., Kawashima K., Sugita T.** (1996) Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim Biophys Acta*, **1316**, 132-138
77. **Tomita N., Morishita R., Lan H.Y., Yamamoto K., Hashizume M., Notake M., Toyosawa K., Fujitani B., Mu W., Nikolic-Paterson D.J., Atkins R.C., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T.** (2000) In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappa B decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 1244-1252
78. **Garg A., Aggarwal B.B.** (2002) Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, **16**, 1053-1068
79. **Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D.** (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, **376**, 167-170
80. **Arsura M., Wu M., Sonenshein G.E.** (1996) TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity*, **5**, 31-40
81. **Boothby M.R., Mora A.L., Scherer D.C., Brockman J.A., Ballard D.W.** (1997) Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med*, **185**, 1897-1907
82. **Ward C., Chilvers E.R., Lawson M.F., Pryde J.G., Fujihara S., Farrow S.N., Haslett C., Rossi A.G.** (1999) NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis *in vitro*. *J Biol Chem*, **274**, 4309-4318
83. **von Knethen A., Callsen D., Brune B.** (1999) Superoxide attenuates macrophage apoptosis by NF-kappa B and AP-1 activation that promotes cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol*, **163**, 2858-2866

84. **Maggiwar S.B., Sarmiere P.D., Dewhurst S., Freeman R.S.** (1998) Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci*, **18**, 10356-10365
85. **Jimi E., Nakamura I., Ikebe T., Akiyama S., Takahashi N., Suda T.** (1998) Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem*, **273**, 8799-8805
86. **Erl W., Hansson G.K., de Martin R., Draude G., Weber K.S., Weber C.** (1999) Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **84**, 668-677
87. **Abbadie C., Kabrun N., Bouali F., Smardova J., Stehelin D., Vandenbunder B., Enrietto P.J.** (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell*, **75**, 899-912
88. **Dumont A., Hehner S.P., Hofmann T.G., Ueffing M., Droge W., Schmitz M.L.** (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene*, **18**, 747-757
89. **Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R.** (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*, **1**, 543-551
90. **Qin Z.H., Chen R.W., Wang Y., Nakai M., Chuang D.M., Chase T.N.** (1999) Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J Neurosci*, **19**, 4023-4033
91. **Schneider A., Martin-Villalba A., Weih F., Vogel J., Wirth T., Schwaninger M.** (1999) NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med*, **5**, 554-559
92. **DeMeester S.L., Qiu Y., Buchman T.G., Hotchkiss R.S., Dunnigan K., Karl I.E., Cobb J.P.** (1998) Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med*, **26**, 1500-1509
93. **Bakker T.R., Reed D., Renno T., Jongeneel C.V.** (1999) Efficient adenoviral transfer of NF-kappaB inhibitor sensitizes melanoma to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Int J Cancer*, **80**, 320-323
94. **McDade T.P., Perugini R.A., Vitimberga F.J. Jr., Callery M.P.** (1999) Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery*, **126**, 371-377
95. **Sumitomo M., Tachibana M., Ozu C., Asakura H., Murai M., Hayakawa M., Nakamura H., Takayanagi A., Shimizu N.** (1999) Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression. *Hum Gene Ther*, **10**, 37-47
96. **Sovak M.A., Bellas R.E., Kim D.W., Zanieski G.J., Rogers A.E., Traish A.M., Sonenshein G.E.** (1997) Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest*, **100**, 2952-2960
97. **Koong A.C., Chen E.Y., Giaccia A.J.** (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res*, **54**, 1425-1430
98. **Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M., Kaukonen J., Palotie A., Joukov V., Alitalo K.** (1997) Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem*, **272**, 25176-25183

99. **Ueda A., Okuda K., Ohno S., Shirai A., Igarashi T., Matsunaga K., Fukushima J., Kawamoto S., Ishigatsubo Y., Okubo T.** (1994) NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*, **153**, 2052-2063
100. **Miyamoto S., Chiao P.J., Verma I.M.** (1994) Enhanced I kappa B alpha degradation is responsible for constitutive NF-kappa B activity in mature murine B-cell lines. *Mol Cell Biol*, **14**, 3276-3282
101. **Giri D.K., Aggarwal B.B.** (1998) Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem*, **273**, 14008-14014
102. **Visconti R., Cerutti J., Battista S., Fedele M., Trapasso F., Zeki K., Miano M.P., de Nigris F., Casalino L., Curcio F., Santoro M., Fusco A.** (1997) Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene*, **15**, 1987-1994
103. **Mukhopadhyay T., Roth J.A., Maxwell S.A.** (1995) Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **11**, 999-1003
104. **Palayoor S.T., Youmell M.Y., Calderwood S.K., Coleman C.N., Price B.D.** (1999) Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*, **18**, 7389-7394
105. **Wood K.M., Roff M., Hay R.T.** (1998) Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB. *Oncogene*, **16**, 2131-2139
106. **O'Neill L.A., Kaltschmidt C.** (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*, **20**, 252-258
107. **Bakalkin G.Y., Yakovleva T., Terenius L.** (1993) NF-kappa B-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissue-specific expression. *Brain Res Mol Brain Res*, **20**, 137-146
108. **Meberg P.J., Kinney W.R., Valcourt E.G., Routtenberg A.** (1996) Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res Mol Brain Res*, **38**, 179-190
109. **Hunot S., Brugg B., Ricard D., Michel P.P., Muriel M.P., Ruberg M., Faucheux B.A., Agid Y., Hirsch E.C.** (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7531-7536
110. **Yu Z., Zhou D., Cheng G., Mattson M.P.** (2000) Neuroprotective role for the p50 subunit of NF-kappaB in an experimental model of Huntington's disease. *J Mol Neurosci*, **15**, 31-44
111. **Migheli A., Piva R., Atzori C., Troost D., Schiffer D.** (1997) c-Jun, JNK/SAPK kinases and transcription factor NF-kappa B are selectively activated in astrocytes, but not motor neurons, in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 1314-1322
112. **Bonetti B., Stegagno C., Cannella B., Rizzuto N., Moretto G., Raine C.S.** (1999) Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol*, **155**, 1433-1438
113. **Guo Q., Robinson N., Mattson M.P.** (1998) Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *J Biol Chem*, **273**, 12341-12351

114. **Ainbinder E., Revach M., Wolstein O., Moshonov S., Diamant N., Dikstein R.** (2002) Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, **22**, 6354-6362
115. **Li C., Wang Y., Gao L., Zhang J., Shao J., Wang S., Feng W., Wang X., Li M., Chang Z.** (2002) Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D(3). *Cell Growth Differ*, **13**, 27-38
116. **Azuma Y., Ohura K.** (2002) Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF-kappaB DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells. *Scand J Immunol*, **56**, 260-269
117. **Busuttill V., Bottero V., Frelin C., Imbert V., Ricci J.E., Auberger P., Peyron J.F.** (2002) Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene*, **21**, 3213-3224
118. **Nagase T., Kikuno R., Ishikawa K., Hirose M., Ohara O.** (2000) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*, **7**, 143-150
119. **Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., et al.** (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16899-16903
120. **Baldwin A.S. Jr.** (2001) Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*, **107**, 3-6
121. **Otsuka F., Iwamatsu A., Suzuki K., Ohsawa M., Hamer D.H., Koizumi S.** (1994) Purification and characterization of a protein that binds to metal responsive elements of the human metallothionein IIA gene. *J Biol Chem*, **269**, 23700-23707
122. **Ozyhar A., Gries M., Kiltz H.H., Pongs O.** (1992) Magnetic DNA affinity purification of ecdysteroid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **43**, 629-634
123. **Gabrielsen O.S., Hornes E., Korsnes L., Ruet A., Oyen T.B.** (1989) Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor tau--a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res*, **17**, 6253-6267.
124. **Myokai F., Takashiba S., Lebo R., Amar S.** (1999) A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4518-4523
125. **Aebersold R., Mann M.** (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**, 198-207

8 Abkürzungen

Amp.....	Ampicillin
ARD.....	Ankyrin Repetitionsdomäne
Aqua bidest.....	zweifach destilliertes Wasser
bp.....	Basenpaare
BSA.....	bovines Serumalbumin
°C.....	Grad Celsius
COX-2.....	induzierbare Cyclooxygenase
Dif.....	Drosophila Immunitätsfaktor
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
dATP.....	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP.....	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP.....	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP.....	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DTT.....	Dithiothreitol
EDTA.....	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS.....	fetales Kälber-Serum
G-CSF.....	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF.....	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GST.....	Glutathion S-Transferase
h.....	Stunde
Hind III.....	Restriktionsenzym vom Bakterium <i>Haemophilus influenzae</i>
HIV-1.....	menschliches Immundefizienz-Virus Typ 1
HPLC.....	high performance liquid chromatographie
ICAM-1.....	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon γ
I κ B.....	Inhibitorprotein von NF- κ B
IKK.....	I κ B-Kinase Komplex
IL.....	Interleukin
iNOS.....	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kDa.....	Kilodalton
LB-Medium.....	Luria Bertani Medium
LPS.....	Lipopolysaccharid
LTR.....	long terminal repeat
M.....	Proteinmarker
MCP-1.....	Monozyten-attrahierendes Protein 1
M-CSF.....	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC.....	major histocompatibility complex
min.....	minute
MIP-1 α	Macrophagen inflammatorisches Protein 1 alpha
NES.....	nukleäre Exportsequenz
NF- κ B.....	nukleärer Faktor kappa B
NLS.....	nukleäres Lokalisationssignal
NP-40.....	Nonidet P-40
nZE.....	nukleärer Zellextrakt

OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pfu-Polymerase	DNS-Polymerase vom Bakterium <i>Pyrokokkus furiosus</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol II	RNA-Polymerase II
RHD	Rel Homologiedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TA	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TLR-2	Toll-like Rezeptor 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheit für die Messung der Enzymaktivität)
UV-Strahlung	Ultraviolett-Strahlung
VCAM-1	vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül 1
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	prozentuale Konzentrationsangabe in ml pro 100 ml Flüssigkeit
w/v	prozentuale Konzentrationsangabe in g pro 100 ml Flüssigkeit

Masseinheiten

		Stoffmenge	Konzentration	Gewicht	Volumen
1		Mol (6.02×10^{23})	M Molar	g Gramm	L Liter
10 ⁻³	milli-	mmol	mM	mg	ml
10 ⁻⁶	mikro-	μmol	μM	μg	μl
10 ⁻⁹	nano-	nmol	nM	ng	nl
10 ⁻¹²	pico-	pmol	pM	pg	pl

		Länge	Energie
1		m Meter	J Joule
10 ⁻¹	dezi-	dm	
10 ⁻²	zenti-	cm	
10 ⁻³	milli-	mm	mJ

9 Dankesadressen

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Dr. Michael Hottiger für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung meiner Arbeit, die sorgfältige Korrektur der Dissertation und die Übernahme des Referates.

Prof. Dr. Hanspeter Naegeli für die Durchsicht der Dissertation und die Übernahme des Korreferates.

Dr. Sameez Hasan für die Einführung in die Laborarbeit und die hervorragende Unterstützung und Betreuung während der Dissertation.

Ralph Imhof für seine wertvolle Unterstützung während der Dissertation und speziell für die Bearbeitung der Proben für die Massenspektrometrie am Functional Genomics Center Zürich und die Hilfe bei der Auswertung von deren Resultaten.

Dr. Paul Hassa für die Weitergabe der TLR-2- und HIV-Vektorkonstrukte und für die vielen nützlichen Ratschläge.

Allen übrigen Institutsmitarbeitern, im Besonderen bei **Nazim El-Andaloussi, Christine Bürki, Marcela Covic, Cornelia Lombardi, Heather Owen, Dr. Taras Valovka, Elena Ferrari, Erica Friedrich-Heineken, Carmela Coppola** und **Barbara Wirz**.

Dr. Manfredo Quadroni für die Ausführung der Massenspektrometrieanalysen am Institute de Biochimie, Lausanne.

Meinen Eltern und Geschwistern für die grosse moralische Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Sibylle Kuonen** für ihre Geduld und die grosse Unterstützung während dieser Dissertation und für die wertvolle Kritik beim Durchlesen der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei der „Kantonalen Drucksachen- und Materialzentrale Zürich“ für den Druck der Dissertation.

Lebenslauf

Fabian Kälin

geboren am 9. Mai 1978 in Lachen (SZ)
Heimatort: Einsiedeln (SZ)

- 1985 – 1991 Primarschule in Einsiedeln
- 1991 – 1998 Gymnasium an der Stiftsschule Einsiedeln
- 1998 Matura Typus B
- 1998 – 2003 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
- 2003 Eidgenössisches Staatsexamen der Veterinärmedizin in Zürich
- 2000 – 2003 Dissertation am Institut für Veterinärbiochemie und Molekularbiologie der Universität Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. M. Hottiger

Dezember 2003